

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 263**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2011** **E 14170628 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016** **EP 2813851**

54 Título: **Composiciones y métodos para el diagnóstico de trastornos renales en un felino**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2016

73 Titular/es:

HILL'S PET NUTRITION, INC. (100.0%)
400 Southwest 8th Street
Topeka, KS 66603, US

72 Inventor/es:

AL-MURRANI, SAMER WALEED;
GAO, XIANGMING y
MALLADI, SUKHASWAMI

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 590 263 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

Composiciones y métodos para el diagnóstico de trastornos renales en un felino

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con composiciones, materiales y métodos para el diagnóstico y/o seguimiento de enfermedades renales y trastornos en felinos, incluyendo métodos para: diagnóstico de, elaboración y seguimiento de un plan de tratamiento para, y seguimiento del estado de, un trastorno renal caracterizado por una pérdida anormal de función renal, insuficiencia renal, medición de la filtración glomerular reducida o glomerulonefritis, en un felino, mediante la medición de expresión de genes seleccionados.

Listado de secuencias

10 La presente solicitud contiene una lista de secuencias que se ha presentado a través de EFS-Web y se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 30 de marzo de 2010, es nombrada 8888POUS.txt y tiene 7,809 bytes de tamaño.

Antecedentes de la invención

15 La nefritis es un término general para la inflamación del riñón, que puede ser una enfermedad proliferativa o destructiva focal o difusa que implica el glomérulo, túbulo renal o el tejido intersticial del riñón (o conectivo). La nefritis puede progresar a través de una serie de etapas que terminan en la enfermedad renal terminal o insuficiencia renal terminal. La forma más común de la nefritis es la glomerulonefritis.

20 La glomerulonefritis o nefritis glomerular ("GN") es una afección caracterizada por la inflamación de los glomérulos o bucles capilares del riñón. La afección se presenta en forma aguda, subaguda y crónica y puede ser idiopática o secundaria a una infección, enfermedad o exposición a una toxina.

La insuficiencia renal es la incapacidad del riñón para mantener sus funciones normales. Como resultado, los productos de desecho metabólicos y metabolitos se acumulan en la sangre. Estos productos de desecho y los metabolitos pueden afectar negativamente a sistemas más corporales. Las perturbaciones en el mantenimiento de los equilibrios de fluidos y electrolitos son características de la insuficiencia renal.

25 La insuficiencia renal aguda puede ocurrir de repente debido a un traumatismo, infección, inflamación o exposición a sustancias nefrotóxicas. Esta afección puede dar lugar a la deshidratación, hipotensión y colapso circulatorio. La insuficiencia renal aguda frecuentemente es segregada en tres categorías: (1) insuficiencia pre-renal, que se asocia con la disminución del flujo sanguíneo renal; (2) insuficiencia intrarrenal, que se asocia con isquemia y toxinas; y (3) insuficiencia post-renal, que resulta de la obstrucción del flujo de orina.

30 La insuficiencia renal crónica implica una pérdida progresiva de la función renal que eventualmente puede progresar a enfermedad o insuficiencia renal en fase terminal. Al inicio, la insuficiencia renal crónica comienza ya que la función renal disminuye, sin acumulación apreciable de productos metabólicos de desecho en la sangre. A medida que la tasa de filtración glomerular disminuye debido a la inflamación, los productos de desecho comienzan a acumularse. La enfermedad progresa a uremia debido a la función renal baja, y altos niveles de productos finales de proteínas comienzan a acumularse y poner en peligro las funciones corporales. Las causas más comunes de
35 insuficiencia renal crónica incluyen: inflamación, infección, obstrucción del tracto urinario y ciertas enfermedades y toxicidades sistémicas, incluyendo hipercalcemia, lupus eritematoso, diabetes mellitus e hipertensión.

40 Enfermedad renal en fase terminal se caracteriza por insuficiencia renal crónica irreversible. Los niveles de nitrógeno ureico y creatinina en suero sanguíneo siguen aumentando y la uremia resultante perjudica todos los sistemas corporales. El riñón puede sufrir la pérdida permanente y casi completa de la función, del orden de 10% o menos de la función renal normal. Una de las causas de la enfermedad renal en fase terminal es glomerulonefritis. Otras causas incluyen los mencionados para la insuficiencia renal crónica.

45 Los glomérulos son uno de los componentes estructurales de la nefrona del riñón y se componen de pequeños vasos sanguíneos descritos con frecuencia como un penacho o racimo capilar. La nefrona es la unidad estructural y funcional básica del riñón, que también se compone de una estructura conocida como un malpigio, o cápsula de Bowman, al igual que comprende las arteriolas y los túbulos. La cápsula de Bowman contiene los bucles de los glomérulos y los túbulos renales. Los glomérulos son capilares muy pequeños, por lo tanto, el flujo de sangre a través de estos vasos es muy lento y moléculas en la sangre fácilmente pueden llegar a ser depositadas en las paredes de estos tubos capilares minúsculos. Los túbulos renales se componen de una membrana basal y
50 revestimiento epitelial y sirven para secretar, recoger y conducir la orina.

Los glomérulos funcionan como un filtro dentro de la nefrona. Agua y pequeñas moléculas en la sangre fluyen a través del glomérulo y se filtran a través de una estructura conocida como la membrana basal, que se forma por el

glomérulo y la cápsula de Bowman. El filtrado que comprende agua y pequeñas moléculas pasa a través del túbulo renal que se absorbe y se reabsorbe antes de ser finalmente convertido en la orina. La membrana basal se compone de poros de diversos tamaños, que sirven para filtrar pequeñas moléculas y para impedir el paso a través de la membrana basal de las moléculas más grandes. La función específica de la nefrona es eliminar del plasma ciertos productos finales del metabolismo tales como ácido úrico, urea y creatinina, así como exceso de electrolitos, por ejemplo, iones de sodio, cloruro y potasio. Por la reabsorción de agua y electrolitos, la nefrona juega un papel importante en mantener el equilibrio normal de líquidos en el cuerpo.

La creatinina es un compuesto nitrogenado formado como resultado del metabolismo de la creatina. La creatina, a su vez, es una sustancia no proteica que se sintetiza en el cuerpo a partir de tres aminoácidos, arginina, glicina y metionina. La molécula se encuentra en el músculo en pequeñas cantidades y, cuando se combina con fosfato como fosfocreatina, sirve como una forma de almacenamiento de fosfato de alta energía utilizada en diversos procesos metabólicos. La creatinina se absorbe en la sangre y en última instancia se excreta en la orina. Por lo tanto, una simple prueba de laboratorio para medir la creatinina en la sangre puede ser utilizada para determinar la función renal. La prueba se refiere con frecuencia como una prueba de depuración de creatinina, que mide la cantidad de creatinina depurada del plasma en un rango de tiempo dado. Debido a que la creatinina se forma a partir de la fosfocreatina en cantidades relativamente constantes, un aumento en los niveles de creatinina en la sangre es indicativo de un mal funcionamiento del riñón, esto es, pérdida de la función renal.

La glomerulonefritis puede surgir como resultado de un insulto biológico con el sistema inmunológico. Las sustancias extrañas pueden adherirse a la membrana basal y causar una respuesta inmune que resulta en la producción de anticuerpos. Estos anticuerpos pueden combinar con las sustancias extrañas para causar complejos inmunes que se depositan en las paredes de los pequeños capilares glomerulares, lo que resulta en daños a la nefrona. Alternativamente, en algunos individuos el sistema inmune puede crear autoanticuerpos que son inmunoglobulinas que pueden atacar las células del riñón que resulta en una denominada respuesta autoinmune. Si se alteran las proteínas en el cuerpo, una respuesta de autoanticuerpos puede sobrevenir debido a que los autoanticuerpos reconocen las proteínas alteradas como no propio. Estos complejos de autoanticuerpo-proteína pueden igualmente ser depositados sobre la membrana basal del glomérulo causando una interrupción del funcionamiento de la nefrona.

La glomerulonefritis es una causa común de proteinuria en los felinos y puede ser o bien la forma idiopática o secundaria de la afección. En la última situación, la afección se puede desarrollar enfermedades inflamatorias, secundarias a neoplasia, disfunciones endocrinas, infecciones o nefropatías familiares. Al igual que en los seres humanos, la glomerulonefritis en felinos es a menudo mediada inmunológicamente, con la participación de inmunoglobulinas y factores de complemento en el cuerpo del animal. La lesión se produce dentro de los glomérulos del riñón que resulta en cambios morfológicos en los glomérulos. Eventualmente, la lesión es irreversible y da lugar a un mal funcionamiento de las nefronas.

La glomerulonefritis se caracteriza en la literatura científica en un número de formas diferentes en función de los cambios histopatológicos que tienen lugar. La glomerulonefritis membranosa implica el engrosamiento de la membrana basal glomerular. La glomerulonefritis proliferativa o mesangioproliferativa se caracteriza por la proliferación de células en la matriz mesangial. La glomerulonefritis membranoproliferativa implica una combinación de los cambios anteriores. La glomeruloesclerosis se caracteriza por el aumento de formación de la matriz y cicatrización. En algunos casos hay cambios mínimos en los glomérulos, y sólo un ligero aumento en la proliferación de células mesangiales.

Un número de métodos han sido desarrollados para el estudio de la expresión diferencial de genes, por ejemplo, micromatrices de ADN, secuenciación de etiqueta expresada (EST), análisis en serie de la expresión de genes (SAGE), hibridación sustractiva, clonación sustractiva y visualización diferencial (DD) de ARNm, PCR cebada arbitrariamente del ARN (RAP-PCR), PCR en tiempo real (RT-PCR), análisis de la diferencia representacional (RDA), electroforesis en gel bidimensional, espectrometría de masas, y micromatriz de proteína basada en unión de anticuerpos para las proteínas.

Debido a la complejidad de las rutas biológicas implicadas en la enfermedad renal y las interacciones moleculares inherentes y procesos de señalización intercelular, es muy deseable para entender a un nivel genético las interacciones que se están produciendo. La detección de genes desregulados en la fase inicial de pérdida de la función renal en felinos es útil en la comprensión de la biología de la enfermedad renal, especialmente glomerulonefritis sobre una base genómica. El hecho de que la desregulación del gen se puede detectar en una fase inicial de desarrollo de la enfermedad en animales sometidos a lesión isquémica repetida es útil en el diseño de métodos para el diagnóstico de, y elaboración y seguimiento de un plan de tratamiento para, una pérdida anormal de la función renal, insuficiencia renal, medición de la filtración glomerular reducida o glomerulonefritis, en un felino.

Una comprensión más detallada de las rutas biológicas que participan a través de perfiles de expresión de genes ayudará en el desarrollo de procedimientos de diagnóstico, reactivos y kits de prueba, así como farmacéutica saludable, intervenciones nutracéuticos y nutricionales (dietéticos) en las rutas de la enfermedad. Estos enfoques pueden permitir la detección temprana y potencialmente previenen o tratan la enfermedad renal subyacente,

particularmente glomerulonefritis, así como en el seguimiento del pronóstico de la insuficiencia renal en fase inicial y glomerulonefritis, especialmente en felinos. Los genes desregulados implicados en la patología de estos trastornos pueden servir como biomarcadores importantes para el diagnóstico y, potencialmente, la prevención o el tratamiento del trastorno y para optimizar la selección de las intervenciones nutricionales (dietéticas), farmacéuticas, y nutracéuticos apropiados.

El nivel de la expresión de genes y/o la determinación del nivel de funcionamiento de un producto génico expresado en un felino se puede utilizar para seleccionar un agente apropiado para uso terapéutico o profiláctico. Estos datos pueden ser empleados por el experto en la selección de fármacos apropiados como agentes para la prevención o tratamiento de enfermedades renales en felinos a través de perfiles de expresión de genes. Los datos de expresión de genes y el análisis también se pueden utilizar para seleccionar composiciones nutricionales, suplementos dietéticos, nutracéuticos y que tienen un efecto saludable sobre el rendimiento de riñón mediante la utilización de biomarcadores indicativos de un estado saludable de la función renal.

Sólo el trabajo muy limitado que se ha hecho hasta la fecha en la detección del genoma de felino para perfiles de expresión de genes en relación con el diagnóstico de enfermedades en los felinos. No se han llevado a cabo ampliamente estudios realizados en poblaciones sanas de felinos frente a las poblaciones que tienen una enfermedad tal como enfermedad renal y pérdida de la función renal como se describe en esta descripción. Se dispone de pocos datos con respecto al perfil de expresión del genoma felino, especialmente con respecto al desarrollo de enfermedades renales en los felinos con el tiempo.

La insuficiencia renal es una causa principal de muerte en los felinos. Para tratar eficazmente la enfermedad renal, es importante abordar el problema a tiempo, antes de que el riñón esté seriamente dañado. En el momento que el sujeto está mostrando signos de insuficiencia renal, el daño puede ser irreversible. Esto presenta un desafío, ya que la enfermedad renal en su fase inicial puede no tener síntomas manifiestos. De acuerdo con lo anterior, existe una necesidad de mejores métodos para identificar a los animales en la fase inicial de la enfermedad renal, de modo que puedan ser tratados apropiadamente, por ejemplo, dándoles dietas apropiadas en el caso de afecciones idiopáticas, y/o el tratamiento de afecciones tales como infección o enfermedad autoinmune que puede estar contribuyendo al problema con el fin de ayudar a revertir o al menos retrasar e inhibir la progresión de la afección.

Antecedentes de la técnica

Van Hoek et al, 2008, (Journal of Veterinary Internal Medicine, Vol. 23, No. 5, páginas 1031-1037) describe un inmunoensayo de la proteína de unión de la retina urinaria como marcador putativo renal en gatos.

Polzin et al, 2000, (Journal of Felino Medicine and Surgery, Vol. 2, páginas 75-82) describe el manejo dietético de la insuficiencia renal crónica felina.

Yamamura et al, 2010, (Molecular Cancer Therapeutics, Vol. 9, No. 6, páginas 1680-1687) describe las funciones oncogénicas de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled en el cáncer renal humano.

Esteve and Bovolenta, 2010, (The Tohoku Journal of Experimental Medicine, Vol. 221, No. 1, páginas 11-17) describe las ventajas y desventajas de expresión de Sfrp1 y Sfrp 2 en eventos patológicos.

Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención provee un método para diagnosticar la existencia de un trastorno renal en un felino que comprende medir el nivel de expresión de proteína 2 secretada relacionada con frizzled en una muestra biológica del felino, en donde las diferencias de expresión de proteína 2 secretada relacionada con frizzled en la muestra con relación a un valor de control para la expresión en una muestra de un animal normal indican la existencia de un trastorno renal.

En un segundo aspecto, la presente invención provee un uso de un kit en el método definido en este documento para el diagnóstico de la existencia de un trastorno renal en un felino, en donde el kit comprende medios para medir la expresión de genes de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled en una muestra biológica de un felino; e instrucciones para usar tales medios para medir la expresión de los uno o más biomarcadores en una muestra biológica del felino y para diagnosticar la existencia de un trastorno renal en el felino.

En un tercer aspecto, la presente invención provee un uso de una secuencia de nucleótidos correspondiente o complementaria a un gen de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled de felino; opcionalmente en donde la secuencia de nucleótidos corresponde a o es complementaria a SEQ ID NO: 1; o de un anticuerpo para proteína 2 secretada relacionada con frizzled de felino; en un método como se define en este documento.

La presente descripción provee además composiciones y métodos para: diagnóstico de, elaboración y seguimiento de un plan de tratamiento para, y el seguimiento del estado de un trastorno renal que se caracteriza por una pérdida anormal de función renal, insuficiencia renal, medición de la filtración glomerular reducida o glomerulonefritis, en un

- felino, en donde el trastorno renal es detectable mediante la utilización de al menos un biomarcador relevante aislado y medido a partir de una muestra de ensayo biológica tomada de tal felino, en donde la expresión del biomarcador se correlaciona positiva o negativamente con la enfermedad. Un biomarcador relevante para la práctica de las composiciones y métodos de la presente invención comprende un polinucleótido o proteína presente en dicha muestra de prueba biológica de tal felino. Una muestra de prueba biológica para la práctica del método de la invención puede comprender, por ejemplo, una muestra de tejido de un riñón de tal felino. Se seleccionaron los biomarcadores también sobre la base de ser secretados, por lo que se pueden detectar en el suero sanguíneo o plasma, o en orina. De acuerdo con lo anterior, la muestra de prueba biológica también puede ser una muestra de un fluido biológico tomada de tal felino, por ejemplo sangre u orina.
- La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que determinados perfiles de expresión de genes en los felinos se correlacionan con un cambio en dicho animal de un proceso biológico normal a un anormal en el riñón que puede conducir a una disminución de la función renal con el tiempo. Una correlación de un perfil de expresión de genes particular, con una disminución de la función renal se puede predecir, detectar y diagnosticar en un felino sin hacer un diagnóstico clínico convencional basado en signos y síntomas clínicos reconocidos en la técnica de la enfermedad renal. Un perfil de expresión de genes alterado en un felino es, por lo tanto, un factor de predicción de una disminución de la función renal, como de otro modo podrían ser diagnosticados en un momento posterior por medio de mediciones reconocidas en la técnica de la función renal. Tales mediciones reconocidas en la técnica de la función renal por lo general pueden incluir, por ejemplo, una de las siguientes medidas: medición de la filtración glomerular, medición de depuración de creatinina, niveles de proteína en orina, niveles de creatinina en suero, niveles de creatinina en orina, niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN), marcación metabólica con radioisótopos, obtención de imágenes de los tejidos blandos, incluyendo ecografía, exploración de resonancia magnética y/o tomografía computarizada. Los ensayos no invasivos, tales como creatinina sérica y niveles de BUN por lo general muestran poca correlación con la histopatología del riñón y en general no serían un factor de predicción de los cambios futuros en el riñón.
- La presente descripción provee, por ejemplo, métodos de medición de la existencia de un trastorno renal caracterizado por una pérdida anormal de la función renal, insuficiencia renal, medición de la filtración glomerular reducida o glomerulonefritis, implican la evaluación del nivel o actividad de la expresión de genes de al menos un gen de felino homólogo o el producto de la traducción de dicho gen seleccionado del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2); proteína 5 de unión al retinol (rbp5); lumican (LUM); decorina (DCN); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1); y metaloproteínasa de la matriz-2, -7 y -19 (MMP2, MMP7 y MMP19). En la presente invención, el biomarcador es la proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2).
- La invención provee, por ejemplo, métodos de medición de la existencia de un trastorno renal caracterizado por una pérdida anormal de insuficiencia renal, medición de la filtración glomerular reducida o glomerulonefritis, implican la evaluación del nivel o actividad de la expresión de genes de al menos un gen felino homólogo o el producto de la traducción de dicho gen seleccionado del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) y proteína 5 de unión al retinol (rbp5); y, opcionalmente, un segundo grupo de al menos un gen felino homólogo o el producto de traducción de tal gen seleccionado del grupo que consiste en: lumican (LUM); decorina (DCN); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1); y metaloproteínasa de la matriz-2, -7 y -19 (MMP2, MMP7 y MMP19). En la presente invención, el biomarcador es la proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2). En una realización, la presente invención abarca uno o más genes o segmentos de genes ("genes" como se define en este documento) que son expresados diferencialmente en los animales anormales en comparación con los animales normales. La invención se basa en el descubrimiento de polinucleótidos que son expresados diferencialmente en los animales anormales en comparación con los animales normales. Los genes fueron identificados mediante la comparación de la expresión de genes en muestras de tejido tomadas de animales diagnosticados como anormales con genes en muestras de tejido de animales diagnosticados como normales, utilizando tecnología de Affymetrix GeneChip®.
- Los polinucleótidos y genes se identifican mediante la medición de las diferencias en expresión de genes de muestras de tejidos tomadas de felinos diagnosticados como anormales y que tiene un trastorno renal con la expresión de genes en muestras de tejido de los felinos diagnosticados como normal. Los cambios en la expresión de genes se pueden determinar por cualquier método conocido por los expertos. Generalmente, los cambios en la expresión de genes se determinan mediante la medición de la transcripción (determinando la cantidad de ARNm producido por un gen) o la medición de la traducción (determinando la cantidad de proteína producida por un gen). La cantidad de ARN o proteína producida por un gen se puede determinar utilizando cualquier método conocido para los expertos para la cuantificación de polinucleótidos y proteínas.
- En general, la expresión de ARNm se determina utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (incluyendo, sin limitación, PCR con transcripción inversa (RT-PCR) y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)) matrices de oligonucleótidos cortos o largos, matrices de ADNc, secuenciación EST, transferencia de Northern, SAGE, MPSS, MS, matrices de perlas y otros métodos de hibridación. Por lo general, el ARN es medido en forma de ARNm o ARNm transcrito inverso.

La expresión de proteína o polipéptido se determina utilizando diversos ensayos y métodos colorimétricos y espectroscópicas tales como transferencias Western cuantitativas, ELISA, geles 2D, cromatografía de gases o líquidos, espectrometría de masas, el ensayo de Lowry, el ensayo de Biuret, ensayos de fluorescencia, métodos turbidimétricos, el ensayo bicinconinico, tecnología de chips de proteínas, absorbancia infrarroja, ninhidrina, el ensayo de Bradford, y la absorbancia ultravioleta.

Los chips de genes permiten un estudio a gran escala de los procesos biológicos y la medición de la actividad dentro de una célula en un cierto momento. El análisis de micromatrices permite contar las diferencias en los fenotipos sobre una base genética a gran escala. La medición real de los productos de expresión de genes es un indicador más preciso de la función del gen que la determinación de secuencias *per se*. El análisis de micromatrices se basa en la cuantificación de la concentración de transcrito de ARNm del gen en una célula en un momento dado. El AND se inmoviliza sobre un medio y el ARNm diana marcado se hibrida con sondas en la matriz. La unión del ARNm marcado de las sondas se mide por análisis de láser. La medición es un conteo de protones emitidos. El chip entero es escaneado y se obtiene la imagen digital. La imagen se procesa para localizar las sondas y para asignar mediciones de intensidad para cada sonda. De esta manera se pueden determinar los genes de expresión inducida o inhibida. El análisis permite al experto encontrar grupos de genes con similares perfiles de expresión y para determinar los tejidos con los perfiles de expresión similares. De esta manera, los genes que explican las diferencias observadas en las muestras de tejido pueden ser identificados.

Los chips de genes Affymetrix por lo general emplean sondas de 25bp y conjuntos de sondas de 11 a 20 sondas correspondientes a un gen particular o EST. El chip se construye con una sonda de apareamiento erróneo y apareamiento perfecto de 25bp cada una, siendo el primero perfectamente complementario a una región específica de un gen y el último que tiene el 13º bp sustituido para hacer un apareamiento erróneo. Un algoritmo de resumen de la sonda se utiliza para determinar la corrección de fondo, normalización y resumen de la sonda, que es la conversión de los valores de la sonda a los valores de expresión de la sonda. RMA es uno de los algoritmos que se pueden utilizar para este propósito. El algoritmo lleva a cabo las dos últimas etapas de análisis, normalización y resumen de las mediciones de intensidad de la sonda de nivel. Los valores de apareamiento perfecto, por lo tanto, son la corrección de fondo, normalizado y se resumen en un conjunto de mediciones de expresión.

Los datos en bruto se analizaron utilizando el software GeneSpring versión 7.0 (GS) (Agilent Corporation) y validados utilizando el software de distribución libre (RB) R-Bioconductor. Ambos paquetes de software se utilizan para calcular intensidades de la sonda de los archivos CEL generados por el instrumento de Affymetrix. Las llamadas Presente/Ausente/Marginal por sonda y los valores de P se calcularon utilizando el R-Bioconductor y el software GeneSpring por separado.

En general, la expresión diferencial de genes en animales anormales en comparación con los animales normales se determina midiendo la expresión de al menos un gen. Preferiblemente, la expresión de dos o más genes expresados diferencialmente se mide para proporcionar un patrón de expresión de genes o perfil de la expresión de genes. Más preferiblemente, la expresión de una pluralidad de genes expresados diferencialmente se mide para proporcionar información adicional para un patrón o perfil de expresión de genes más significativo.

La presente descripción provee una pluralidad de marcadores que juntos o por separado son o pueden ser utilizados como marcadores de la enfermedad renal. En aspectos especialmente útiles de la invención, una pluralidad de estos marcadores se puede seleccionar y su expresión de ARNm se puede medir simultáneamente para proporcionar perfiles de expresión para su uso en varios aspectos de la invención descrita en esta solicitud. En un aspecto preferido de los presentes métodos y composiciones, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 marcadores se seleccionan del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9); proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No.: 10); lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No.: 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No.: 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No.: 13); metaloproteinasa de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No.: 14); metaloproteinasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No.: 15); y metaloproteinasa de la matriz-19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No.: 16) y se pueden utilizar para la determinación de perfiles de expresión de genes empleados en la práctica de los métodos descritos en este documento. Cada marcador puede ser particularmente unida a ciertos aspectos de la enfermedad renal. En la presente invención, el biomarcador es la proteína 2 secretada relacionada con Frizzled (SFRP2).

La presente descripción provee una pluralidad de marcadores que juntos o por separado son o pueden ser utilizados como marcadores de la enfermedad renal. En otro aspecto especialmente útil de la descripción, una pluralidad de estos marcadores se puede seleccionar y su expresión de ARNm se puede medir simultáneamente para proporcionar perfiles de expresión para su uso en diversos aspectos de los métodos descritos en esta solicitud. En un aspecto preferido de los presentes métodos y composiciones, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 marcadores se seleccionan del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9) y proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No.: 10); y, opcionalmente, un segundo grupo de al menos un polinucleótido

seleccionado del grupo que consiste en: lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No.: 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No.: 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No.: 13); metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No.: 14); metaloproteínasa de la matriz -7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No.: 15); y metaloproteínasa de la matriz-19 (MMP 19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No.: 16) y se pueden utilizar para la determinación de perfiles de expresión de genes empleados en la práctica de los métodos descritos en este documento. Cada marcador puede estar unido particularmente a ciertos aspectos de enfermedad renal. En la presente invención, el biomarcador es la proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2).

En otro aspecto, la descripción provee un dispositivo apropiado para detectar la expresión de una pluralidad de genes expresados diferencialmente en los felinos anormales en comparación con los felinos normales. El dispositivo comprende un sustrato que tiene una pluralidad de las sondas de oligonucleótidos o polinucleótidos de la presente invención fijado al sustrato en posiciones conocidas. El dispositivo es esencialmente una versión inmovilizada de las sondas de oligonucleótidos o polinucleótidos descritos en este documento. El dispositivo es útil para la detección rápida y específica de los genes y polinucleótidos y sus patrones y perfiles de expresión. Por lo general, tales sondas están unidas a un sustrato o soporte sólido similar y una muestra que contiene uno o más polinucleótidos (por ejemplo, un gen, un producto de PCR, un producto de reacción en cadena de la ligasa (LCR), una secuencia de ADN que ha sido sintetizada utilizando técnicas de amplificación, o una mezcla de los mismos) se expone a las sondas de tal manera que el(los) polinucleótido(s) de la muestra puede hibridar con las sondas. Las sondas, el(los) polinucleótido(s) de la muestra, o ambos, se marcan, por lo general con un fluoróforo u otra etiqueta tal como estreptavidina, y detectado utilizando métodos conocidos para los expertos. Si el(los) polinucleótido(s) de la muestra está(n) marcado(s), la hibridación se puede detectar mediante la detección de la fluorescencia unida. Si las sondas se marcan, la hibridación se detecta por lo general por inactivación de la etiqueta. Si tanto la sonda como el(los) polinucleótido(s) de la muestra se marcan, la hibridación se detecta normalmente mediante el seguimiento de un cambio de color resultante de la proximidad de las dos etiquetas unidas. Una variedad de estrategias de etiquetado y etiquetas, se conoce para los expertos, en particular para las etiquetas fluorescentes. Preferiblemente, las sondas se inmovilizan en sustratos apropiados para la formación de una matriz (conocida por varios nombres, incluyendo micromatriz de ADN, chips de genes, biochip, chip de ADN, y matriz de genes) comparable a los conocidos en la técnica.

Los métodos para determinar la cantidad o concentración de la proteína en una muestra son conocidos para los expertos. Tales métodos incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis de transferencia Western, y ensayos ELISA. Para los métodos que utilizan anticuerpos, los anticuerpos policlonales y monoclonales son apropiados. Tales anticuerpos pueden ser inmunológicamente específicos para una proteína, epítipo de proteína, o fragmento de proteína.

Algunas realizaciones de la invención utilizan anticuerpos para la detección y cuantificación de proteínas producidas mediante la expresión de los polinucleótidos de la presente invención. Aunque las proteínas se pueden detectar mediante inmunoprecipitación, separación por afinidad, análisis de transferencia Western, matrices de proteínas, y similares, un método preferido utiliza la tecnología de ELISA en donde el anticuerpo se inmoviliza sobre un soporte sólido y una proteína diana o péptido se expone al anticuerpo inmovilizado. Ya sea la sonda, o la diana, o ambas, se pueden marcar utilizando métodos conocidos.

En un aspecto adicional, la descripción provee un método para la detección de la expresión diferencial de uno o más genes expresados diferencialmente en los felinos anormales en comparación con los felinos normales en una muestra. El método comprende (a) hibridación de una combinación que comprende una pluralidad de sondas de polinucleótidos que son expresadas diferencialmente en los felinos anormal en comparación con los felinos normales con los polinucleótidos de la muestra para formar uno o más complejos de hibridación; (b) opcionalmente, la hibridación de una combinación que comprende una pluralidad de sondas de polinucleótidos que son expresados diferencialmente en los felinos anormales en comparación con los felinos normales con polinucleótidos en un estándar para formar uno o más complejos de hibridación; (c) detectar los complejos de hibridación de la muestra y, opcionalmente, el estándar de la etapa (b); y (d) comparar los complejos de hibridación de la muestra con los complejos de hibridación a partir de un estándar, en donde una diferencia en la cantidad de complejos de hibridación entre el estándar y la muestra indica la expresión diferencial de genes expresados diferencialmente en los animales anormales en comparación con los animales normales en la muestra .

La etapa (b) y parte de la etapa (c) son opcionales y se utilizan si se va a realizar una comparación relativamente simultánea de dos o más sistemas de prueba. Sin embargo, en una realización preferida, el estándar utilizado para la comparación se basa en los datos obtenidos previamente utilizando el método.

Estas sondas se exponen a una muestra para formar complejos de hibridación que se detectan y se comparan con los de un estándar. Las diferencias entre los complejos de hibridación de la muestra y el estándar indican la expresión diferencial de polinucleótidos y por lo tanto los genes expresados diferencialmente en felinos anormales en comparación con los felinos normales en la muestra. En un aspecto preferido, se hacen sondas para detectar

específicamente polinucleótidos o fragmentos de los mismos producidos por uno o más de los genes o fragmentos de genes identificados por la presente invención. Los métodos para detectar complejos de hibridación son conocidos para los expertos.

5 En otro aspecto, la descripción provee un método para la detección de la expresión diferencial de genes expresados diferencialmente en los felinos anormales en comparación con los felinos normales en una muestra. El método comprende (a) hacer reaccionar una combinación que comprende una pluralidad de sondas de polipéptidos con proteínas en la muestra en afecciones que permiten que se produzca la unión específica entre las sondas y las proteínas, en donde las proteínas unidas por las sondas se expresan diferencialmente en un felino anormal en comparación con un felino normal; (b) opcionalmente, hacer reaccionar una combinación que comprende una pluralidad de sondas de polipéptidos con proteínas en un estándar en afecciones que permiten que se produzca la unión específica entre las sondas y las proteínas, en donde las proteínas unidas por las sondas se expresan diferencialmente en un felino anormal en comparación con un felino normal; (c) detectar la unión específica en la muestra y, opcionalmente, el estándar de la etapa (b); y (d) comparar la unión específica en la muestra con la de un estándar, en donde las diferencias entre la unión específica en el estándar y la muestra indican la expresión diferencial de genes expresados diferencialmente en los felinos anormales en comparación con los felinos normales en la muestra.

20 Estas sondas se exponen a una muestra para formar la unión específica que se detecta y se compararon con las de un estándar. Las diferencias entre la unión específica de la muestra y el estándar indican expresión diferencial de las proteínas y por lo tanto los genes expresados diferencialmente en los felinos anormales en comparación con los felinos normales, particularmente genes asociados con anormalidad, en la muestra. En un aspecto preferido, se hacen sondas para detectar específicamente proteínas o fragmentos de los mismos producidos por uno o más de los genes o fragmentos de genes identificados por la presente invención.

25 En una realización, el método comprende además la exposición del felino o muestra a una sustancia de ensayo antes de la reacción de los polipéptidos con las proteínas. A continuación, la comparación es indicativa de si la sustancia de prueba alteró la expresión de genes expresados diferencialmente en los felinos anormales en comparación con los felinos normales, particularmente genes asociados con anormalidad, en la muestra.

30 Los animales diagnosticados por métodos de la presente invención como que tienen un trastorno renal, por ejemplo, tal como la glomerulonefritis, se colocan preferiblemente en una dieta de protección renal. Las dietas de protección del riñón incluyen, por ejemplo, las dietas como se describen anteriormente y en WO 2006/119049 A2, WO 2006/071952, y los contenidos de las cuales se incorporan en este documento por referencia.

35 La descripción provee de este modo, un método (Método 1) de diagnóstico de la existencia de un trastorno renal en un felino que comprende medir el nivel de expresión del uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en lumican (LUM); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1); decorina (DCN); proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2); proteína 5 de unión al retinol (rbp5); MMP-2; MMP-7; y MMP-19, en una muestra biológica del felino, en donde diferencias en la expresión del uno o más biomarcadores en la muestra respecto a un valor de control para la expresión en una muestra de un animal normal indican la existencia de un trastorno renal. En la presente invención, el biomarcador es la proteína 2 secretada relacionada con Frizzled (SFRP2). A modo de ejemplo, se pueden utilizar cualquiera de los siguientes métodos:

40 1.1. Método 1, en donde se determina el nivel de expresión del uno o más biomarcadores, mediante la medición de la expresión de genes del uno o más biomarcadores utilizando ya sea (i) una micromatriz de ADN que comprende uno o más oligonucleótidos complementarios a ARNm o ADNc correspondiente a los uno o más biomarcadores que se van a medir, o (ii) una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con cebadores de oligonucleótidos para ARNm o ADNc correspondientes a los uno o más biomarcadores que se van a medir, por ejemplo,

45 a. El método precedente en donde la etapa de medición de la expresión de genes del uno o más biomarcadores comprende (i) aislar el ARN de la muestra de tejido, (ii) transcripción inversa del ARN para obtener el ADNc correspondiente, (iii) aislar y fragmentar el ADNc así obtenido, (iv) poner en contacto los fragmentos de ADNc con una micromatriz de ADN que comprende uno o más oligonucleótidos complementarios a ADNc correspondientes a los uno o más biomarcadores que se van a medir, y (v) detectar la hibridación entre los fragmentos de ADNc y el uno o más oligonucleótidos en la micromatriz de ADN .

50 b. El método precedente en donde los oligonucleótidos en la micromatriz de ADN comprenden una o más sondas capaces de hibridarse con una o más de SEQ ID NOS. 9-16.

c. El método precedente en donde los oligonucleótidos en la micromatriz de ADN comprenden una o más sondas que comprenden secuencias seleccionadas de una o más de SEQ ID NOS. 1-8.

55 d. Cualquiera de los métodos precedentes que implican la detección de hibridación en donde la hibridación entre los fragmentos de ADNc y el uno o más oligonucleótidos en la micromatriz de ADN es en condiciones rigurosas.

- 1.2. Método 1, en donde el nivel de expresión del biomarcador se detecta por un anticuerpo para la proteína expresada.
- 5 a. Método 1.2 en donde el biomarcador se detecta mediante un inmunoensayo seleccionado de un ensayo de unión competitiva, un ensayo de unión no competitiva, un radioinmunoensayo, un ensayo inmunoabsorbente con enzima ligada (ELISA), un ensayo de tipo sándwich, una reacción de precipitina, un ensayo de inmunodifusión de difusión en gel, un ensayo de aglutinación, un inmunoensayo fluorescente, inmunoensayo de quimioluminiscencia, inmunoensayo immunoPCR, un inmunoensayo de proteína A o proteína G y un ensayo de inmunoelectroforesis.
- b. El método precedente que es un ensayo inmunoabsorbente con enzima ligada (ELISA).
- c. Método 1.2, en donde el ensayo es un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral.
- 10 d. Método 1.2, en donde la muestra biológica es sangre u orina.
- 1.3. Método 1, en donde el nivel de expresión del biomarcador se detecta por medición de espectroscopia cuantitativa masa de la proteína expresada en la muestra biológica, por ejemplo, en donde la muestra biológica es sangre u orina.
- 15 1.4. Método 1, en donde el nivel de expresión del biomarcador se detecta por un aptámero que reconoce la proteína expresada.
- a. Método 1.4, en donde el aptámero es un oligonucleótido.
- b. Método 1.4, en donde el aptámero es un péptido.
- c. Método 1.4, en donde la muestra biológica es sangre u orina.
- 20 1.5. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde el nivel de expresión del uno o más biomarcadores en la muestra biológica con relación a un valor de control para la expresión en la muestra normal es mayor de dos veces, por ejemplo, mayor de cinco veces, o menos de un medio.
- 1.6. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde el nivel de expresión del uno o más biomarcadores en la muestra biológicas es al menos una desviación estándar más alta o más baja que la media de expresión de los biomarcadores en una muestra normal.
- 25 1.7. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde el nivel de expresión del uno o más biomarcadores en las muestras biológicas se normaliza respecto a la expresión de uno o más genes conocidos por tener expresión relativamente constante.
- 1.8. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde la muestra biológica es una muestra de tejido renal.
- 1.9. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde la muestra biológica es sangre.
- 30 1.10. Cualquiera de los métodos precedentes, que comprende la detección de niveles de expresión de proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) y/o proteína 5 de unión al retinol (rbp5).
- 1.11. Cualquiera de los métodos precedentes, que comprende la detección de niveles de expresión de proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) y/o proteína 5 de unión al retinol (rbp5) y, opcionalmente, niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: lumican (LUM); decorina (DCN); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1)); metaloproteinasa de la matriz-2 (MMP2); metaloproteinasa de la matriz-7 (MMP7); y metaloproteinasa de la matriz-19 (MMP19).
- 35 1.12. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde el trastorno renal está en una fase inicial, por ejemplo, en donde el felino tiene la función renal esencialmente normal, por ejemplo, según se mide por una o más de las siguientes: medición de la filtración glomerular normal, medición de depuración de creatinina, niveles de proteína en orina, niveles de creatinina en suero, niveles de creatinina urinaria, niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN), marcación metabólica con radioisótopos, obtención de imágenes de tejidos blandos, incluyendo ecografía, exploración de resonancia magnética y/o tomografía computarizada.
- 40 1.13. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde el trastorno renal es un trastorno caracterizado por una pérdida anormal de la función renal, insuficiencia renal, medición de la filtración glomerular reducida o glomerulonefritis.
- 45 1.14. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde el trastorno renal es glomerulonefritis.

1.15. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde el trastorno renal está indicado por una diferencia significativa en la expresión de uno o más de los siguientes en relación con los valores de expresión control (por ejemplo, en donde una "diferencia significativa" en el caso de aumento de la expresión es un incremento de al menos dos veces, y en el caso de disminución de expresión es una disminución de al menos 50%):

- 5 Incremento de la expresión de lumican;
Incremento de la expresión de la cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12;
Incremento de la expresión de la decorina;
Incremento de la expresión de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled;
Reducción de la expresión de la proteína 5 de unión al retinol reducida;
- 10 Incremento de la expresión de MMP-2;
Incremento de la expresión de MMP-7; y/o
Incremento de la expresión de MMP-19.
- 15 En una realización adicional, la invención provee un método (método 2) de tratamiento, mejora, o retraso de la progresión de un trastorno renal en un felino en necesidad del mismo, que comprende el diagnóstico de la existencia de un trastorno renal por ejemplo, utilizando el método 1, y siguientes, y el manejo de la afección, por ejemplo, por una dieta y/o medicación. Por ejemplo, la invención provee:
- 2.1. Método 2 que comprende proporcionar una dieta de protección renal como sustancialmente la dieta única para un felino que tiene un trastorno renal como diagnosticado o diagnosticable por el método de cualquiera de los métodos 1, y siguientes.
- 20 2.2. Método 2 o 2.1, en donde el felino tiene la función renal esencialmente normal, por ejemplo, tal como se mide mediante uno o más de los siguientes: medición de la filtración glomerular normal, medición de depuración de creatinina, niveles de proteína en orina, niveles de creatinina en suero, niveles de creatinina urinaria, niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN), marcación metabólica con radioisótopos, obtención de imágenes de tejidos blandos, incluyendo ecografía, exploración de resonancia magnética y/o tomografía computarizada.
- 25 2.3. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde el felino tiene al menos cinco años.
- 2.4. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde el trastorno es un trastorno caracterizado por una pérdida anormal de la función renal, insuficiencia renal, medición de la filtración glomerular reducida o glomerulonefritis.
- 2.5. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde el trastorno renal es glomerulonefritis.
- 2.6. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde el felino se ha identificado con la enfermedad renal.
- 30 2.7. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde el felino se mantiene en la dieta de protección renal durante un periodo de al menos aproximadamente 6 meses.
- 2.8. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde el felino se mantiene en la dieta de protección renal durante un período que se inicia después de la aparición o el diagnóstico inicial de la enfermedad renal y continuando durante sustancialmente el resto de la vida del felino.
- 35 2.9. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde la dieta de protección renal comprende uno o más de los siguientes: modificaciones en relación con una dieta estándar de felino:
- Reducción del fósforo
Niveles reducidos de proteínas
Reducción de sodio
- 40 Niveles elevados de ácidos grasos omega-3
Niveles elevados de vitaminas del complejo B
Incremento de antioxidantes.

- 2.10. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde la dieta de protección renal comprende desde aproximadamente 18% a aproximadamente 40% de proteína, desde aproximadamente 0.2% a aproximadamente 0.85% de fósforo, y desde aproximadamente 0.04% a aproximadamente 0.35% de sodio, en una base de materia seca.
- 5 2.11. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde la dieta de protección renal provee desde aproximadamente 3.6 a aproximadamente 7.9 g/100 kcal ME de proteína, desde aproximadamente 0.04 a aproximadamente 0.17 g/100 kcal ME de fósforo, y desde aproximadamente 0.008 a aproximadamente 0.07 g/100 kcal ME de sodio.
- 2.12. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde la dieta de protección renal comprende un alimento seco que comprenden proteína en una cantidad desde aproximadamente 5% a aproximadamente 40%, fósforo en una cantidad desde aproximadamente 0.01% a aproximadamente 2%, y sodio en una cantidad desde aproximadamente 0.01% a aproximadamente 2%, sobre una base "como alimentado".
- 10 2.13. Cualquiera de los métodos precedentes, en donde la dieta de protección renal comprende un alimento hidratado que comprenden proteína en una cantidad desde aproximadamente 4% a aproximadamente 12%, fósforo en una cantidad desde aproximadamente 0.03% a aproximadamente 0.2%, y de sodio en una cantidad desde aproximadamente 0.03% a aproximadamente 0.2%, sobre una base "como alimentado".
- 15 En un aspecto adicional, la descripción provee reactivos, opcionalmente marcados, útiles en la detección del nivel de expresión del uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en lumican; cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12; decorina; proteína 2 secretada relacionada con frizzled; proteína 5 de unión al retinol; MMP-2; MMP-7; y MMP-19 en un felino, por ejemplo,
- 20 a. Los anticuerpos, por ejemplo anticuerpos monoclonales, anticuerpos de cadena sencilla, y fragmentos de anticuerpos funcionales, que reconocen proteínas felinas seleccionados del grupo que consiste en lumican; cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12; decorina; proteína 2 secretada relacionada con frizzled; proteína 5 de unión al retinol; MMP-2; MMP-7; y MMP-19.
- 25 b. Los aptámeros, por ejemplo ácido nucleico o aptámeros peptídicos, que reconocen las proteínas felinas seleccionadas del grupo que consiste en lumican; cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12; decorina; proteína 2 secretada relacionada con frizzled; proteína 5 de unión al retinol; MMP-2; MMP-7; y MMP-19.
- c. Proteína de felino aislada y purificada o recombinante seleccionada del grupo que consiste en lumican; cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12; decorina; proteína 2 secretada relacionada con frizzled; proteína 5 de unión al retinol; MMP-2; MMP-7; y MMP-19.
- 30 d. Las sondas de oligonucleótido capaces de hibridar con un gen felino seleccionado del grupo que consiste en lumican; cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12; decorina; proteína 2 secretada relacionada con frizzled; proteína 5 de unión al retinol; MMP-2; MMP-7; y MMP-19, por ejemplo, capaces de hibridarse a una o más de SEQ ID NOS. 9-16, por ejemplo seleccionada de una o más de SEQ ID NOS. 1-8.
- 35 En un aspecto adicional, la descripción provee un kit (Kit 1) para el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de un trastorno renal en un felino, que comprende
- a. medio para medir la expresión de genes del uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en lumican; cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12; decorina; proteína 2 secretada relacionada con frizzled; proteína 5 de unión al retinol; MMP-2; MMP-7; y MMP-19 en una muestra biológica del felino, y
- 40 b. instrucciones de uso de tal medio para medir la expresión del uno o más biomarcadores en una muestra biológica del felino y la evaluación de la presencia de un proceso que conduce a un trastorno renal en el felino, por ejemplo,
- 1.1 Kit 1 en donde los medios para la medición de los uno o más biomarcadores es una o más sondas de ácido nucleico capaces de detectar la expresión de genes del uno o más biomarcadores;
- 1.2 Kit 1.1, en donde las una o más sondas de ácido nucleico son capaces de hibridarse con una o más de SEQ ID NOS. 9-16, por ejemplo, en condiciones rigurosas;
- 45 1.3 Kit 1.2 en donde las una o más sondas de ácido nucleico comprenden una secuencia o secuencias seleccionadas de una o más de SEQ ID NOS. 1-8.
- 1.4 Cualquiera de los kits precedentes, que comprende una micromatriz de ADN que comprende una o más sondas de ácido nucleico capaces de detectar la expresión de genes del uno o más biomarcadores.

- 1.5 Kit 1, en donde el medio para la medición de los uno o más biomarcadores es uno o más anticuerpos capaces de detectar la expresión de genes del uno o más biomarcadores mediante el reconocimiento de la proteína expresada.
- 5 1.6 Kit 1.5 en formato ELISA que comprende anticuerpos capaces de detectar el uno o más biomarcadores; proteína aislada, purificada o recombinante que corresponde a la proteína expresada; y solución reguladora.
- 1.7 Kit 1, en donde el medio para la medición de los uno o más biomarcadores es uno o más aptámeros, por ejemplo, como se describe anteriormente, capaz de detectar la expresión de genes del uno o más biomarcadores mediante el reconocimiento de la proteína expresada.
- 10 1.8 Cualquiera de los kits precedentes, en donde los uno o más biomarcadores incluyen proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) y/o proteína 5 de unión al retinol (rbp5);
- 1.9 Cualquiera de los kits precedentes adaptados para su uso en cualquiera del Método 1 anterior y siguientes, o el método 2, y siguientes.
- La descripción provee además el uso
- 15 de una secuencia de nucleótidos correspondiente o complementaria a un gen para lumican de felino; cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12; decorina; proteína 2 secretada relacionada con frizzled; proteína 5 de unión al retinol; MMP-2; MMP-7; y MMP-19, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos correspondiente o complementaria a cualquiera de SEQ ID NO 1-16, o
- de un anticuerpo a una proteína seleccionada de felino lumican; cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12; decorina; proteína 2 secretada relacionada con frizzled; proteína 5 de unión al retinol; MMP-2; MMP-7; y MMP-19, o
- 20 de un aptámero para una proteína seleccionada del lumican de felino; cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12; decorina; proteína 2 secretada relacionada con frizzled; proteína 5 de unión al retinol; MMP-2; MMP-7; y MMP-19, o
- lumican de felino aislada, purificada o recombinante; cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12; decorina; proteína 2 secretada relacionada con frizzled; proteína 5 de unión al retinol; MMP-2; MMP-7; y MMP-19,
- en un método de acuerdo con el Método 1, y siguientes, o Método 2 y siguientes, o
- 25 en la fabricación de un kit de acuerdo con el Kit 1, y siguientes.
- Otras áreas de aplicabilidad de la presente invención se harán evidentes a partir de la descripción detallada proporcionada en lo sucesivo. Se debe entender que la descripción y los ejemplos específicos detallados, aunque indican la realización preferida de la invención, están destinadas para fines de ilustración solamente y no pretenden limitar el alcance de la invención.
- 30 Breve descripción de los dibujos
- La figura 1a es un gráfico del nivel de cambio de la media geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión de genes de *Canis familiaris* similar al precursor lumican (proteoglicano sulfato de queratano lumican) ARNm.
- 35 La figura 1b es un gráfico de la intensidad de RMA de la media geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión de genes de *Canis familiaris* similar al ARNm del precursor lumican (sulfato de queratano proteoglicano lumican).
- La figura 2a es un gráfico del nivel de cambio de la media geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión de genes de *Equus caballus* similar a ARNm del colágeno alfa 1 (III).
- 40 La figura 2b es un gráfico de la intensidad de RMA de la media geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión de genes de *Equus caballus* similar a colágeno alfa 1 (III) ARNm.
- La figura 3a es un gráfico del nivel de cambio de la media geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión de ARNm de decorina del gen felino *Canis lupus familiaris*, felinos completos.
- La figura 3b es un gráfico de la intensidad de RMA de la media geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión de ARNm de decorina del gen felino *Canis familiaris lupus*, felinos completos.

La figura 4a es un gráfico de la intensidad del nivel de cambio de la media geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión de genes de ARNm de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled de *Canis familiaris lupus*.

5 La figura 4b es un gráfico de la RMA de la media geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión de genes del ARNm de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled de *Canis lupus familiaris*.

La figura 5a es un gráfico de nivel de cambio de la media geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión de genes de ARNm de la metaloproteinasas de la matriz 2 del *Canis familiaris*.

10 La figura 5b es un gráfico de la intensidad de RMA de la media geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión de genes de ARNm de la metaloproteinasas de la matriz 2 del *Canis familiaris*.

La figura 6a es un gráfico del nivel de cambio de la media geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión de ARNm PUMP-1 del gen *Felis domesticus*.

La figura 6b es un gráfico de la intensidad de RMA de la media geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión de ARNm PUMP-1 del gen de *Felis domesticus*.

15 La figura 7a es un gráfico de las veces el cambio promedio geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión del ARNm del gen de *Macaca mulatta*.

La figura 7b es un gráfico de la intensidad de RMA de la media geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión del ARNm del gen *Macaca mulatta*.

20 La figura 8a es un gráfico del nivel de cambio de la media geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión de genes felino similar a proteína 5 de unión al retinol *Canis familiaris*, celular.

La figura 8b es un gráfico de la intensidad de RMA de la media geográfica frente a la etapa de la glomerulonefritis de un sujeto felino para la expresión de genes similar a proteína 5 de unión al retinol *Canis familiaris* celular.

Descripción detallada de la invención

25 La siguiente descripción de las realizaciones preferidas es de naturaleza meramente ejemplar y de ningún modo pretenden limitar la invención, su aplicación o usos.

Ciertas definiciones

30 Como se utiliza en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario, por ejemplo, la referencia a "una variante" incluye una pluralidad de variantes. Además, los términos definidos incluyen variaciones de los términos utilizados en el contexto gramatical apropiado, por ejemplo, la expresión "se une específicamente" incluye "unión específica" y otras formas del término. Del mismo modo, las palabras "comprenden", "comprende" y "que comprende" se deben interpretar inclusivamente en vez de exclusivamente.

35 El término "anticuerpo" significa cualquier inmunoglobulina que se une a un antígeno específico, incluyendo anticuerpos IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE. El término incluye anticuerpos policlonales, monoclonales, monovalentes, humanizados, heteroconjugados, composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, quiméricos, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, y fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, u otros fragmentos de unión a antígeno.

40 El término "matriz" significa una disposición ordenada de al menos dos sondas en un sustrato. Al menos una de las sondas es un control o estándar y al menos una de las sondas es una sonda de diagnóstico. La disposición desde aproximadamente dos a aproximadamente 40,000 sondas sobre un sustrato asegura que la intensidad y el tamaño de la señal de cada complejo marcado formado entre una sonda y un polinucleótido o polipéptido de la muestra es distinguible individualmente. La colección de moléculas depositadas en la matriz se puede preparar ya sea sintética o biosintéticamente. La matriz puede tomar una variedad de formas, incluyendo bibliotecas de moléculas solubles, bibliotecas de compuestos atados a perlas de resina, chips de sílice u otros soportes sólidos. La matriz de ácido nucleico puede incluir las bibliotecas de ácidos nucleicos que se pueden preparar mediante la detección de ácidos nucleicos en esencialmente cualquier longitud (por ejemplo, desde 1 a aproximadamente 1,000 nucleótidos de longitud) sobre un sustrato. Una matriz de sondas de ácido nucleico comprende preferiblemente ácidos nucleicos unidos a un sustrato en ubicaciones conocidas. En otras realizaciones, el sistema puede incluir un soporte o sustrato sólido, tal como una membrana, filtro, portaobjetos de microscopio, micropozos, tubos de muestra, perlas, matriz de perlas, o similares. El soporte sólido puede estar hecho de diversos materiales, incluyendo papel, celulosa, nylon, poliestireno, policarbonato, plástico, vidrio, cerámica, acero inoxidable, o similares. El soporte sólido puede tener

preferiblemente una superficie rígida o semirrígida, y preferiblemente puede ser esférico (por ejemplo, perla) o sustancialmente plano (por ejemplo, superficie plana) con pozos apropiados, regiones elevadas, zanjas grabadas al agua fuerte, o similares. El soporte sólido también puede incluir un gel o matriz en la que pueden estar incrustados ácidos nucleicos.

5 El término "biomarcadores" significa genes y productos génicos codificados por un gen de la invención o un homólogo de felino del mismo, especialmente un homólogo de felino del mismo, en donde se ha determinado que el gen se ha expresado diferencialmente como resultado de una enfermedad, afección, trastorno o la administración de una sustancia, fármacos, nutriente o componente de la dieta o combinaciones de los mismos, y en donde dichos genes y productos de genes de la invención se identifican en SEQ ID NOS .: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, y 16 o un gen homólogo del mismo, incluyendo, sin limitación, un gen felino. Un biomarcador puede ser un polinucleótido, polipéptido, proteína, ARN, incluyendo un transcrito de ARN o su producto de traducción, ADN, ADNc, un metabolito de una o más de las moléculas anteriores, o una variante útil de cualquiera de las moléculas anteriores, la expresión diferencial de la que está asociada con un trastorno renal, incluyendo, sin limitación glomerulonefritis, y en donde la correlación de tal expresión diferencial en una muestra tomada de un animal de ensayo a una muestra tomada de un animal de control se puede utilizar en el diagnóstico, pronóstico, seguimiento o tratamiento de la afección, enfermedad o trastorno en un animal en necesidad del mismo. Además, un biomarcador puede ser utilizado generalmente para referirse a cualquier parte o segmento de dicho gen o proteína que se puede identificar o correlacionar con el gen o proteína de longitud completa, por ejemplo, en un ensayo u otro método de la invención. La expresión de biomarcadores también se puede identificar mediante la detección de la traducción biomarcador (esto es, detección de la proteína de biomarcadores en una muestra). Métodos apropiados para la detección de la proteína de biomarcadores incluyen cualquier método apropiado para detectar y/o medir proteínas a partir de un extracto celular o célula. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, inmunotransferencia (por ejemplo, transferencia Western), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Los métodos particularmente preferidos para la detección de proteínas incluyen cualquier ensayo de una sola célula, incluyendo ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Tales métodos son bien conocidos en la técnica. Además, los anticuerpos contra algunos de los biomarcadores descritos en este documento son conocidos en la técnica y se describen en la literatura pública, y métodos para su preparación son bien conocidos para el experto.

El término "comparable" como se utiliza para comparar la expresión de una muestra de prueba a una muestra de control se entenderá como indicios del carácter y la cantidad del producto y deberá incluir, sin limitación, los valores dentro de una desviación estándar en torno al valor medio de la cual dicha comparación se hace y los valores que abarcan la expresión diferencial entre la muestra de ensayo y muestra de control.

Los términos "genes expresados diferencialmente", "expresión diferencial de genes", "expresión diferencial" o "expresado diferencialmente" y sus sinónimos, que se utilizan de manera intercambiable, se refieren a un gen cuya expresión se activa a un nivel más alto o más bajo en un sujeto que sufre de una enfermedad, afección, o trastorno, o como resultado de la que se administra una sustancia, fármaco, nutriente o componente de la dieta o combinaciones de los mismos, en relación con su expresión en un sujeto normal o de control. Los términos también incluyen genes cuya expresión está activada a un nivel mayor o menor en diferentes etapas de la misma enfermedad. También se entiende que un gen expresado diferencialmente puede ser ya sea activado o inhibido al nivel de ácido nucleico o al nivel proteína, o puede ser objeto de corte y empalme alternativo para dar como resultado un producto de polipéptido diferente. Tales diferencias pueden ser evidenciadas por un cambio en los niveles de ARNm, expresión superficial, secreción u otra partición de un polipéptido, por ejemplo. La expresión diferencial de genes puede incluir una comparación de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o una comparación de las relaciones de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o incluso una comparación de dos productos procesados de manera diferente del mismo gen, que difieren entre sujetos normales y sujetos que padecen una enfermedad, afección, o trastorno, o como resultado de que se administre una sustancia, fármaco, nutriente o componente de la dieta o combinaciones de los mismos, o entre las diversas etapas de la misma enfermedad, afección, o trastorno, o como resultado de que se administren diferentes cantidades de una sustancia, fármacos, nutriente o componente dietético o combinaciones de los mismos. La expresión diferencial incluye tantas diferencias cuantitativas, así como cualitativas, en el patrón de expresión temporal o celular en un gen o sus productos de expresión entre, por ejemplo, células, normales y enfermas, o entre células que han experimentado diferentes eventos de enfermedad o etapas de la enfermedad. Para el propósito de esta invención, "expresión diferencial de genes" se considera que está presente cuando existe al menos aproximadamente 2.0, 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5, 1.4, 1.3, 1.2, 1.1 o 1.0 veces, preferiblemente al menos aproximadamente dos veces o más, más preferiblemente al menos aproximadamente 2.5, 3 o 4 o más niveles de cambio en la cantidad de polinucleótidos transcritos o proteína traducida en una muestra.

El término "veces" cuando se utiliza como una medida de la expresión diferencial de genes significa una cantidad de la expresión de genes en un felino que es un múltiplo o una fracción de la expresión de genes en comparación con la cantidad de expresión de genes en una comparación de felino, por ejemplo, un felino que tiene una pérdida de la función renal, insuficiencia renal, una medición de filtración glomerular reducida o glomerulonefritis en comparación con un animal que no demuestra dicha afección. Por ejemplo, un gen que se expresa 2 veces más en el animal que en el animal de comparación tiene una expresión diferencial de genes de 2 veces y un gen que se expresa de un

medio más en el animal que en el animal de comparación también tiene una expresión diferencial de genes de 2 veces.

El término "fragmento" significa (1) una secuencia de oligonucleótidos o polinucleótidos que es una parte de una secuencia completa y que tiene la misma o similar actividad para un uso particular como la secuencia de polinucleótido completa o (2) una secuencia de péptido o polipéptido que es una parte de una secuencia completa y que tiene la misma o similar actividad para un uso particular como la secuencia de polipéptido completo. Tales fragmentos pueden comprender cualquier número de nucleótidos o aminoácidos considera apropiado para un uso particular. Generalmente, fragmentos de oligonucleótidos o polinucleótidos contienen al menos aproximadamente 10, 50, 100, o 1000 nucleótidos y fragmentos de polipéptidos contienen al menos alrededor de 4, 10, 20, o 50 aminoácidos consecutivos de la secuencia completa. El término abarca variantes de polinucleótidos y polipéptidos de los fragmentos. Un polinucleótido, por ejemplo, puede estar disuelto, o fragmentado en, una pluralidad de segmentos.

Diversos métodos de fragmentación de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Estos métodos pueden ser, por ejemplo, ya sea química o física en la naturaleza. La fragmentación química puede incluir degradación parcial con una DNasa; despurinación parcial con ácido; el uso de enzimas de restricción; endonucleasas de intrón codificada; métodos de escisión basadas en el ADN, tales como triplex y métodos de formación de híbridos, que se basan en la hibridación específica de un segmento de ácido nucleico para localizar un agente de escisión a una ubicación específica en la molécula de ácido nucleico; u otras enzimas o compuestos que escinden el ADN en ubicaciones conocidas o desconocidas. Métodos de fragmentación físicos pueden implicar someter el ADN a una alta velocidad de cizallamiento. Las altas velocidades de cizallamiento se pueden producir, por ejemplo, moviendo el ADN a través de una cámara o canal con hoyos o espigas, o forzar la muestra de ADN a través de un paso de flujo de tamaño restringido, por ejemplo, una abertura que tiene una dimensión de la sección transversal en la escala del micrón o submicrométrico. Otros métodos físicos incluyen sonicación y nebulización. Las combinaciones de métodos de fragmentación físicos y químicos pueden igualmente ser empleados tales como fragmentación por el calor y la hidrólisis mediada por ion. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) ("Sambrook et al."), que se incorpora en este documento por referencia para todos los propósitos. Estos métodos se pueden optimizar para digerir un ácido nucleico en fragmentos de un rango de tamaño seleccionado. Los rangos de tamaño útiles pueden ser de 100, 200, 400, 700 o 1000 a 500, 800, 1500, 2000, 4000 o 10,000 pares de bases. Sin embargo, los rangos de gran tamaño tales como 4000, 10,000 o 20,000 a 10,000, 20,000 o 500,000 pares de bases también pueden ser útiles.

El término "gen" o "genes" significa un segmento completo o parcial de ADN implicado en la producción de un polipéptido, incluyendo regiones que preceden y siguen a la región codificante (líder y remolque) y secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones). El término abarca cualquier secuencia de ADN que hibrida con el complemento de las secuencias de codificación de genes.

El término "homólogo" significa (1) un polinucleótido, incluyendo polinucleótidos de la misma o diferentes especies de animales, que tienen más del 30%, 50%, 70%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de similitud de secuencia con un polinucleótido y que tiene la misma o sustancialmente las mismas propiedades y la realización de la misma o sustancialmente la misma función que el polinucleótido completo, o que tiene la capacidad de hibridarse específicamente a un polinucleótido en condiciones rigurosas o (2) un polipéptido, incluyendo polipéptidos de la misma o diferentes especies de animales, que tiene más del 30%, 50%, 70%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de similitud de secuencia con un polipéptido identificados mediante la expresión de polinucleótidos y que tienen la misma o sustancialmente las mismas propiedades y la realización de la misma o sustancialmente la misma función que el polipéptido completo, o que tiene la capacidad de unirse específicamente a un polipéptido identificado mediante la expresión de polinucleótidos. La similitud de secuencia de dos secuencias de polipéptidos o de dos secuencias de polinucleótidos se determina utilizando métodos conocidos para los expertos, por ejemplo, el algoritmo de Karlin and Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268 (1990)). Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al. (J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). Para obtener los alineamientos gapped con fines de comparación, Gapped BLAST se puede utilizar como se describe en Altschul et al. (Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se utilizan los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

El término "hibridación" se refiere al proceso en el cual dos polinucleótidos de cadena sencilla se unen de forma no covalente para formar un polinucleótido de cadena doble estable. El término "hibridación" también puede referirse a la hibridación de triple cadena. El polinucleótido de doble cadena resultante (por lo general) es un "híbrido". La proporción de la población de polinucleótidos que forman híbridos estables se denomina en este documento como el "grado de hibridación".

Las reacciones de hibridación pueden ser realizadas en formatos de hibridación absolutos o diferenciales. En el formato de hibridación absoluta, los polinucleótidos derivados de una muestra se hibridan con las sondas en una matriz de ácido nucleico. Las señales detectadas después de la formación de complejos de hibridación se correlacionan con los niveles de polinucleótidos en la muestra. En el formato de hibridación diferencial, los

5 polinucleótidos derivados de dos muestras se marcan con diferentes unidades estructurales de marcación. Se adiciona una mezcla de estos polinucleótidos marcados de forma diferente a una matriz de ácido nucleico. La matriz de ácido nucleico se examina a continuación, en condiciones en las que las emisiones de las dos etiquetas diferentes son detectables individualmente. En una realización, los fluoróforos Cy3 y Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.) se utilizan como las unidades estructurales de marcación para el formato de hibridación diferencial.

10 Las señales recogidas a partir de matrices de ácidos nucleicos se pueden analizar utilizando software disponibles comercialmente, tales como los proporcionados por Affymetrix o Agilent Technologies. Los controles, tales como para la sensibilidad de exploración, marcación de la sonda y cuantificación de ADNc o ARNc, se incluyen preferiblemente en los experimentos de hibridación. Las señales de hibridación se pueden ampliar o normalizar antes de ser objeto de un análisis más detallado. Por ejemplo, las señales de hibridación para cada sonda individual pueden ser normalizadas para tener en cuenta las variaciones en las intensidades de hibridación cuando se utiliza más de una matriz en condiciones de ensayo similares. Las señales de hibridación también se pueden normalizar utilizando las intensidades derivadas de los controles de normalización internos contenidos en cada matriz. Además, 15 los genes con niveles de expresión relativamente consistentes a través de las muestras se pueden utilizar para normalizar los niveles de expresión de otros genes. En una realización, las sondas para ciertos genes de mantenimiento se incluyen en una matriz de ácido nucleico de la presente invención. Estos genes son elegidos porque muestran niveles estables de expresión a través de un conjunto diverso de tejidos. Las señales de hibridación se pueden normalizar y/o escalar en base a los niveles de expresión de estos genes de mantenimiento.

20 El término "complejo de hibridación" significa un complejo que se forma entre los polinucleótidos de la muestra cuando las purinas de hidrógeno de un polinucleótido se unen con las pirimidinas del polinucleótido complementario, por ejemplo, 5'-A-G-T-C-3' pares de bases con 3'-TCAG-5'. El grado de complementariedad y el uso de análogos de nucleótidos afectan a la eficiencia y la rigurosidad de las reacciones de hibridación.

25 El término "sondas de hibridación" incluye los ácidos nucleicos (tales como oligonucleótidos) capaces de unirse de manera específica a la base a una cadena complementaria de ácido nucleico. Tales sondas incluyen ácidos nucleicos peptídicos, como se describe en Nielsen et al., Science 254:1497-1500 (1991), Nielsen Curr. Opin. Biotechnol., 10:71-75 (1999) y otros análogos de ácido nucleico y miméticos de ácidos nucleicos. Véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,156,501 presentada el 3 de Abril, 1996.

30 El término "enfermedad renal" o "trastorno renal" o análogamente "enfermedad renal" o "trastorno renal" se destina a cubrir una pérdida anormal aguda o crónica de la función renal, tal como insuficiencia renal, medición de la filtración glomerular reducida y glomerulonefritis. La glomerulonefritis puede tomar la forma de glomerulonefritis membranosa que implica el engrosamiento de la membrana basal glomerular. Alternativamente, la glomerulonefritis puede tomar la forma de glomerulonefritis proliferativa o mesangioproliferativa, que se caracteriza por la proliferación de células en la matriz mesangial. Además, la glomerulonefritis puede tomar la forma de glomerulonefritis 35 membranoproliferativa que implica una combinación de los cambios anteriores. La glomerulosclerosis es una forma grave de la glomerulonefritis. Los trastornos renal o enfermedad de riñón también incluyen nefritis, nefropatía, hiperfiltración, microalbuminuria leves, albuminuria clínica, nefropatía clínica avanzada, insuficiencia renal crónica, lesiones de papila renal, necrosis tubular y nefropatía diabética, todos como diferencialmente diagnosticado por los veterinarios con conocimientos ordinarios en el arte. El término no pretende abarcar enfermedad poliquistica del riñón de origen genético. 40

Un felino con función renal normal es un felino que es asintomático durante un trastorno renal y no presenta signos ni síntomas de un trastorno renal clínico y no hay cambios en las mediciones de laboratorio clínico de la función renal. La función renal normal se puede determinar por una o más mediciones de, incluyendo, sin limitación, 45 medición de la filtración glomerular, nivel de proteína en la orina, nivel de creatinina en sangre, nivel de creatinina en orina, depuración de creatinina y nitrógeno ureico en sangre.

La "secuencia de ácido nucleico" significa un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido, y fragmentos o porciones de los mismos, y para ADN o ARN de origen genómico o sintético que puede ser de una o de doble cadena, y representan la cadena sentido o antisentido.

50 El término "polinucleótido" u "oligonucleótido" significa un polímero de nucleótidos. El término abarca moléculas de ADN y ARN (incluyendo ADNc y ARNm), ya sea de una o de doble cadena, y si es de una cadena, su secuencia complementaria, ya sea en forma lineal o circular. El término también abarca fragmentos, variantes, homólogos y alelos, según sea apropiado para las secuencias que tienen la misma o sustancialmente las mismas propiedades y realizar la misma o sustancialmente la misma función que la secuencia original. Las secuencias pueden ser totalmente complementarias (sin falta de coincidencias) cuando se alinean o puede tener hasta aproximadamente un 55 30% de apareamiento erróneo de la secuencia. Preferiblemente, para los polinucleótidos, la cadena contiene desde aproximadamente 20 a 10,000 nucleótidos, más preferiblemente desde aproximadamente 150 a 3,500 nucleótidos. Preferiblemente, para los oligonucleótidos, la cadena contiene desde aproximadamente 2 a 100 nucleótidos, más preferiblemente desde aproximadamente 6 a 30 nucleótidos. El tamaño exacto de un polinucleótido u oligonucleótido dependerá de diversos factores y de la aplicación particular y el uso del polinucleótido u oligonucleótido. El término

incluye los polímeros de nucleótidos que se sintetizan y que están aislados y purificados a partir de fuentes naturales. El término "polinucleótido" incluye "oligonucleótido".

5 El término "polipéptido", "péptido" o "proteína" significa un polímero de aminoácidos. El término abarca polímeros de origen natural y de origen no natural (sintéticos) y polímeros en los que miméticos químicos artificiales son sustituidos por uno o más aminoácidos. El término también abarca fragmentos, variantes y homólogos que tienen las mismas o sustancialmente las mismas propiedades y realizan la misma o sustancialmente la misma función que la secuencia original. El término polímeros abarca polímeros de cualquier longitud, que contienen preferiblemente desde aproximadamente 2 a 1000 aminoácidos, más preferiblemente desde aproximadamente 5 a 500 aminoácidos. El término incluye polímeros de aminoácidos que se sintetizan y que se aíslan y purifican a partir de fuentes naturales.

10 El término "sonda" significa (1) un oligonucleótido o polinucleótido, ya sea ARN o ADN, ya sea de origen natural como en una enzima de restricción purificada digerida o producida sintéticamente, que es capaz de hibridar con o de hibridarse específicamente con un polinucleótido con secuencias complementarias a la sonda o (2) un péptido o polipéptido capaz de unirse específicamente a una proteína en particular o fragmento de proteína con la exclusión sustancial de otras proteínas o fragmentos de proteínas. Una sonda de oligonucleótido o polinucleótido puede ser de cadena sencilla o doble. La longitud exacta de la sonda dependerá de muchos factores, incluyendo temperatura, fuente, y uso. Por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, una sonda de oligonucleótido contiene por lo general aproximadamente 10 a 100, 15 a 50, o 15 a 25 nucleótidos. En ciertas aplicaciones de diagnóstico, una sonda de polinucleótido contiene alrededor de 100-1000, 300-600, nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 300 nucleótidos. Las sondas en este documento se seleccionan para ser "sustancialmente" complementarios a diferentes cadenas de una secuencia diana particular. Esto significa que las sondas deben ser suficientemente complementarios para hibridar específicamente o hibridar con sus respectivas secuencias diana bajo un conjunto de afecciones predeterminadas. Por lo tanto, la secuencia de la sonda no necesita reflejar la secuencia complementaria exacta de la diana. Por ejemplo, un fragmento de nucleótidos no complementario puede estar unido al extremo 5' o 3' de la sonda, con el resto de la secuencia de la sonda siendo complementaria a la secuencia diana. Alternativamente, las bases no complementarias o secuencias más largas pueden ser intercaladas en la sonda, siempre que la secuencia de la sonda tenga suficiente complementariedad con la secuencia del polinucleótido diana para hibridarse específicamente con el polinucleótido diana. Una sonda de péptido o polipéptido puede ser cualquier molécula a la que la proteína o el péptido se une específicamente, incluyendo ADN (para las proteínas de unión al ADN), anticuerpos, receptores de membrana celular, péptidos, cofactores, lectinas, azúcares, polisacáridos, células, membranas celulares, orgánulos y membranas de los organelos.

15 20 25 30 Los términos "muestra" y "especimen" significan cualquier de tejido animal o fluido que contiene polinucleótidos, incluyendo células y otro tejido que contiene ADN y ARN. Los ejemplos incluyen: sangre, riñón, conectivo, epitelial, linfóide, músculo, nervioso, esputo, y similares. Una muestra puede ser sólida o líquida y que puede contener ADN, ARN, ADNc, por ejemplo, líquido corporal tales como sangre u orina, células, preparaciones de células o fracciones solubles o alícuotas de los medios de los mismos, cromosomas, orgánulos, y similares.

35 40 El término "unidos específicamente" significa una interacción especial y precisa entre dos moléculas que depende de su estructura, particularmente sus grupos laterales moleculares. Por ejemplo, la intercalación de una proteína reguladora en el surco mayor de una molécula de ADN, los enlaces de hidrógeno a lo largo de la columna vertebral entre dos ácidos nucleicos de cadena sencilla, o la unión entre un epítipo de una proteína y un agonista, antagonista, o un anticuerpo.

45 El término "hibrida específicamente" significa una asociación entre dos polinucleótidos de cadena sencilla de la secuencia suficientemente complementaria para permitir dicha hibridación bajo condiciones predeterminadas utilizadas generalmente en la técnica (a veces denominada "sustancialmente complementaria"). Por ejemplo, el término puede referirse a la hibridación de una sonda de polinucleótido con una secuencia sustancialmente complementaria contenida dentro de una molécula de ADN o ARN de cadena sencilla de acuerdo con un aspecto de la invención, con la exclusión sustancial de la hibridación de la sonda de polinucleótidos con polinucleótidos de cadena sencilla de secuencia no complementaria.

50 55 El término "condiciones rigurosas" significa (1) hibridación en 50% (vol/vol) de formamida con 0.1% de albúmina de suero bovino, 0.1% de Ficoll, 0.1% de polivinilpirrolidona, solución reguladora de fosfato de sodio 50 mM a pH 6.5 con NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C, (2) hibridación en 50% de formamida, 5x SSC (0.75 M NaCl, citrato de sodio 0.075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6.8), 0.1% de pirofosfato de sodio, solución de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmón soncado (50 mg/mL), 0.1% de SDS, y 10% de sulfato de dextrano a 42°C; con lavados a 42°C en 0.2 x SSC y 0.1% de SDS o lavados con NaCl 0.015 M, citrato de sodio 0.0015 M, Na₂SO₄ 0.1% a 50°C o procedimientos reconocidos en la técnica similares empleando baja fuerza iónica similar y agentes de lavado de alta temperatura y agentes de desnaturalización similares.

El término "variaciones útiles" significa (1) para un polinucleótido, los complementos del polinucleótido; los homólogos del polinucleótido y sus complementos; las variantes del polinucleótido, sus complementos, y sus

homólogos; y los fragmentos del polinucleótido, sus complementos, sus homólogos, y sus variantes y (2) para un polipéptido, los homólogos del polipéptido; las variantes del polipéptido y sus homólogos; y los fragmentos del polinucleótido, sus homólogos, y sus variantes.

5 El término "variante" significa (1) una secuencia de polinucleótido que contiene cualquier sustitución, variación, modificación, sustitución, delección o adición de uno o más nucleótidos desde o a una secuencia de polinucleótido y que tiene la misma o sustancialmente las mismas propiedades y realiza la misma o sustancialmente la misma función que la secuencia original y (2) una secuencia de polipéptido que contiene cualquier sustitución, variación, modificación, sustitución, delección o adición de uno o más aminoácidos de o a una secuencia de polipéptido y que
10 tiene la mismas o sustancialmente las mismas propiedades y realiza la misma o sustancialmente la misma función que la secuencia original. Por lo tanto, el término incluye polimorfismos de nucleótido único (SNP) y variantes alélicas e incluye sustituciones de aminoácidos conservativas y no conservativas en polipéptidos. El término también abarca la derivatización química de un polinucleótido o polipéptido y sustitución de nucleótidos o aminoácidos con nucleótidos o aminoácidos que no se producen naturalmente, según sea apropiado.

15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos y cualquiera de los acrónimos utilizados en este documento tienen los mismos significados como se entiende comúnmente por un experto en el arte en el campo de la invención.

Sondas

20 Las sondas útiles en la práctica de los métodos definidos en este documento y que se utilizan en la identificación de los biomarcadores felinos en las muestras felinas comprenden SEQ ID NOS: 1 a 8. Las secuencias de la sonda corresponden a los siguientes números de identificación de sonda utilizada en el chip de gen felino patentado fabricado por Affymetrix, identificado como *Affymetrix Feline GeneChip*®, tal como se describe con más detalle en esta especificación.

25 HP04719_at corresponde a SEQ ID NO. 1, que es útil en la hibridación con un homólogo de felino de la secuencia de ARNm del ARNm del gen canino *Canis familiaris lupus* para la proteína 2 secretada relacionada con frizzled putativa (gen *sfrp2*). La secuencia para el homólogo de felino para que SEQ ID NO. 1 se hibride es SEQ ID. NO. 9. La sonda ID No. corresponde al número de ID utilizado en el *Affymetrix Feline GeneChip*®. La secuencia de ARNm de canino correspondiente se identifica por el número de acceso No. NM_001002987.1 en ID Gen: 475471.

30 HP12767_at corresponde a SEQ ID NO. 2, que es útil en la hibridación con un homólogo de felino de la secuencia de ARNm de *Canis familiaris* similar a la proteína 5 de unión a retinol; celular; transcrito variante 2. La secuencia para el homólogo de felino a la cual SEQ ID NO. 2 hibrida es SEQ ID. NO. 10. La sonda ID No. corresponde al número ID utilizado en el *Affymetrix Feline GeneChip*®. La secuencia de ARNm de canino correspondiente se identifica por LOC477706 y por secuencia de referencia NCBI: XM_848184.1.

35 HP04078_at corresponde a SEQ ID NO. 3, que es útil en la hibridación con el homólogo de felino de la secuencia de ARNm del gen de *Canis familiaris* similar al precursor Lumican (Queratán apropiado proteoglicano lumican) (KSPG lumican). La secuencia de canino correspondiente se identifica por LOC 482599). La secuencia de ARNm de canino correspondiente se identifica por la secuencia de referencia NCBI: XM_539716.2 en Gen ID: 482599.

HP04079_at corresponde a SEQ ID NO. 4, que es útil en la hibridación con el homólogo de felino de la secuencia de ARNm de decorina de *Canis familiaris lupus* (DCN). La secuencia de ARNm canino correspondiente se identifica como secuencia de referencia NCBI: NM_001003228.1 en Gen ID: 403904.

40 HP06873_at corresponde a SEQ ID NO. 5, que es útil en la hibridación con el homólogo de felino de la secuencia de ARNm de *Equus caballus* similar al colágeno; tipo III; alfa 1 (síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV; dominante autosómico La secuencia de ARNm de equino correspondiente es identificado por la secuencia de referencia NCBI: XM_001917620 en Gen ID 100034123.

45 HP00944_at corresponde a SEQ ID NO. 6, que es útil en la hibridación con el homólogo de felino de la secuencia de ARNm de matriz metaloproteínasa-2 (MMP-2) de *Canis familiaris*. La secuencia de ARNm canino correspondiente se identifica por la secuencia de referencia NCBI: XM_535300.2 en Gen ID: 403733.

HP09664_at corresponde a SEQ ID NO. 7, que es útil en la hibridación con la secuencia de ARNm de felino de la construcción sintética del ARNm de *Felis domesticus* PUMP-1. Felino PUMP-1 se identifica como el No. de Acceso U04444.1.

50 HP00012_at corresponde a SEQ ID NO. 8, que es útil en la hibridación con el homólogo de felino de la secuencia de ARNm del predicho: metaloproteínasa de la matriz 19 de *Macaca mulatta*; transcrito variante 1 (MMP19). El número de secuencia de referencia NCBI es XM_001111542 en Gen ID 7100111.

Biomarcadores

Los biomarcadores útiles en la práctica de los métodos definidos en este documento son: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (sFRP2); proteína 5 de unión al retinol (rbp5); lumican (LUM); decorina (DCN); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1); y metaloproteínasa de la matriz-2, -7 y -19 (MMP2, MMP7 y MMP 19), como se describe más completamente a continuación y en las listas de secuencias adjuntas a la presente memoria. En la presente invención, el biomarcador es la proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2).

SEQ ID NO. 9 corresponde a una secuencia de ácido nucleico de felino homóloga a ARNm de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled de *Canis familiaris*. La secuencia canina es identificada por la secuencia de referencia NCBI: NM_001002987.1 y Gen ID: 475471. La secuencia de nucleótidos de longitud completa canina es de 1760 bp. El polipéptido canino correspondiente tiene la secuencia de referencia NCBI NP_001002987.1. La proteína 2 secretada relacionada con frizzled de canino (sFRP2) es un aminoácido 294. Los miembros de la familia de proteínas transmembrana 'frizzled' (FZ) son receptores para miembros de la familia Wnt, ligandos glicosilados ricos en cisteína implicados en una variedad de procesos celulares, incluyendo el control de la polaridad celular y transformación maligna. Las proteínas secretadas relacionadas con Frizzled (SFRPs) parecen actuar como moduladores solubles de la señalización de Wnt al competir con los receptores de frizzled unidas a la membrana para la unión de ligandos Wnt secretados.

SEQ ID NO. 10 corresponde a una secuencia de ácido nucleico de felino homóloga a *Canis familiaris* similar a ARNm de la proteína 5 de unión al retinol, celular, transcrito variante 2 (LOC477706). La secuencia de canino se identifica por secuencia de referencia NCBI XM_848184.1. La secuencia de nucleótidos de longitud completa canina es 511 bp. El polipéptido canino correspondiente tiene secuencia de referencia NCBI XP_853277.1. rbp5 de canino es una proteína de 135 aminoácidos. Rbp5 pertenece a la familia de la lipocalina y se cree que es un portador para el retinol (vitamina A alcohol) intracelularmente.

SEQ ID NO. 11 corresponde a una secuencia de ácido nucleico de felino homóloga a la pronosticada: ARNm del *canis familiaris* similar al precursor lumican (queratán sulfato proteoglicanos lumican) (LOC 482599). La secuencia canina es identificada por la secuencia de referencia NCBI M_539716.2. La secuencia de nucleótidos de canino de longitud completa es 2028 bp. El polipéptido de canino correspondiente tiene secuencia de referencia NCBI XP_539716.1 Canino lumican precursor (sulfato de queratano proteoglicano lumican) es una proteína de 338 aminoácidos. Lumican (LUM) es un proteoglicano sulfatado de matriz extracelular que interactúa con proteínas que están implicadas en el ensamblaje de la matriz tal como colágeno de tipo I y de tipo VI. LUM está implicado en la proliferación celular y morfogénesis de tejidos. Se cree que Lumican desempeña un papel importante en la regulación del conjunto de fibras de colágeno. La proteína es también un socio de unión de TGF-beta.

SEQ ID NO. 12 corresponde a una secuencia de ácido nucleico de felino homóloga a ARNm de Decorina *Canis familiaris* lupus precursor, La secuencia se identifica por secuencia de referencia NCBI NM-001003228,1 en Gen ID 403904. La secuencia de nucleótidos de longitud completa de canino es 1470 bp. La secuencia de polipéptidos de canino correspondiente tiene la secuencia de referencia NCBI: NM_001003228.1. La decorina de canino precursor del polipéptido de canino correspondiente tiene secuencia de referencia NCBI NP_001003228.1. La decorina precursor de canino es una proteína de 360 aminoácidos. La proteína es un proteoglicano de la matriz celular pequeña o pericelular estrechamente relacionado en estructura a proteína biglicano y es un componente del tejido conectivo. La decorina se une a fibrillas del colágeno de tipo I, y juega un papel en el ensamblaje de la matriz. Contiene una cadena de glicosaminoglicano adjunto. Se cree que esta proteína es capaz de suprimir el crecimiento de diversas líneas celulares del tumor. Un número de variantes del transcrito de corte y empalme alternativamente se han identificado en la literatura científica para este gen.

SEQ ID NO. 13 corresponde a una secuencia de ácido nucleico felino homóloga al ARNm del colágeno del *Equus caballus*, tipo III, alfa 1 (síndrome de Ehlers Danlos tipo IV, dominante autosómico) (COL3A1). La secuencia se identifica por secuencia de referencia NCBI XM_001917620.1 en Gen ID 100034123. La secuencia de nucleótidos de longitud completa de equino es 5492 bp. La secuencia de polipéptido de equino correspondiente tiene la secuencia de referencia NCBI: XP_001917655. Colágeno de equino, tipo III, alfa 1 (síndrome de Ehlers Danlos tipo IV, dominante autosómico) (COL3A1) es una proteína de 1466 aminoácidos. El colágeno de tipo III en humanos es un colágeno que forma fibrillas que comprende 3 cadenas alfa-1 (III) y se expresa en embriones tempranos y durante la embriogénesis. En el adulto, el colágeno de tipo III es un componente principal de la matriz extracelular en una variedad de órganos internos y la piel. Las mutaciones en el gen COL3A1, que codifica procolágeno tipo III, causan el síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV, una enfermedad que conduce a la rotura aórtica en la vida adulta temprana.

SEQ ID NO. 14 corresponde a una secuencia de ácido nucleico de felino homóloga para ARNm de metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP-2), de *Canis familiaris*. La secuencia se identifica por secuencia de referencia NCBI XM_535300.2 en Gen ID 4037333. La secuencia de nucleótidos de longitud completa de canino es 2618 bp. La secuencia de polipéptido equino correspondiente tiene la secuencia de referencia NCBI: XP_535300.2. MMP-2 de canino es una proteína de 612 aminoácidos. Esta colagenasa tipo IV es un miembro de un grupo de las metaloproteasas de zinc secretadas que, en los mamíferos, degradan los colágenos de la matriz extracelular. MMP2 tiene tres repeticiones de dominios de fibronectina de tipo II insertados en el dominio catalítico; véase la minirevisión

de metaloproteinasas de la matriz proporcionada por Nagase et al., J. Biol. Chem., 1999, vol. 274 (31): 21491-21494.

5 SEQ ID NO. 15 corresponde a una secuencia de ácido nucleico de felino para ARNm de *Felis domesticus* PUMP-1, cds parcial. La secuencia se identifica como secuencia de referencia NCBI FDU04444 en GeneBank: U04444.1. La secuencia de nucleótidos de longitud completa de felino PUMP-1 es 1001 bp. La secuencia del polipéptido de longitud completa PUMP-1 se identifica como secuencia de GenBank: AAA18222.1. PUMP-1 de felino es una proteína de 262 aminoácidos.

10 SEQ ID NO 16 corresponde a una secuencia de ácido nucleico de felino homóloga a la pronosticada: ARNm de metaloproteinasas de la matriz 19 de *Macaca mulatta*, transcrito variante 1 (MMP-19). La secuencia de mono rhesus se identifica como secuencia de referencia NCBI: XM_0011111542.1. La secuencia de nucleótidos del mono rhesus de longitud total es 2182 bp. La secuencia de polipéptido de longitud completa se identifica como XP_0011111542.1. El mono rhesus MMP-19 es una proteína de 485 aminoácidos.

15 Se debe entender en relación con la discusión de los aspectos de la descripción que la presente divulgación contempla además combinaciones de biomarcadores que comprenden los genes y sus productos de expresión que se seleccionan del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9); proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13);
20 metaloproteinasas de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteinasas de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteinasas de la matriz-19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16). Aspectos de la descripción contemplan la construcción de paneles de biomarcadores a partir de diversas combinaciones de los dos grupos de genes y sus productos de expresión.

25 En ciertas realizaciones de la presente invención, el felino puede tener una función renal normal, tal como se define por las mediciones clínicas reconocidas en la técnica, por ejemplo, medición de la filtración glomerular, depuración de creatinina, niveles de proteína en orina, niveles de creatinina en sangre, niveles de creatinina en orina y/o niveles de nitrógeno ureico en sangre, y los métodos de la invención pueden ser usados para predecir, detectar y diagnosticar en tal felino un cambio de un estado normal a un estado anormal que conduce a un trastorno renal
30 caracterizado por una función renal reducida, insuficiencia renal, medición de la filtración glomerular reducida y glomerulonefritis.

35 En otro aspecto preferido, el método de la descripción se puede practicar por el uso de una matriz que detecta los cambios de expresión de genes, o el nivel o actividad de uno o más genes, o sus productos de expresión, seleccionados del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9); proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13);
40 metaloproteinasas de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteinasas de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteinasas de la matriz-19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16). En un método, tal matriz es una micromatriz de ADN. El nivel de actividad o expresión de uno o más genes se puede determinar midiendo el producto de expresión de tales genes que puede ser un polinucleótido o un polipéptido o proteína. En la presente invención, el producto del gen o de la expresión de genes es la proteína 2 secretada
45 relacionada con Frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO: 9).

50 En otro aspecto preferido, el método de la descripción puede ser practicado por el uso de una matriz que detecta los cambios de expresión de genes, o el nivel o actividad de uno o más genes, o sus productos de expresión, seleccionado del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9) y proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); y, opcionalmente, un segundo grupo de al menos un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13);
55 metaloproteinasas de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteinasas de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteinasas de la matriz-19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16). En un método, tal matriz es una micromatriz de ADN. El nivel de actividad o expresión de uno o más genes se puede determinar midiendo el producto de expresión de tales genes que puede ser un polinucleótido o un polipéptido o proteína. En la presente invención, el producto del gen o la expresión de genes es la proteína 2 secretada
60 relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO: 9).

- En un aspecto, la descripción incluye poner en contacto una muestra de tejido o una muestra de líquido corporal con un agente que detecta en un felino uno o más genes o el producto de expresión de dichos uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9); proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13); metaloproteínasa de la matriz- 2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteínasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteínasa de la matriz-19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16). El agente puede ser un anticuerpo o una sonda de ácido nucleico utilizada junto con medios de ensayo convencional tales como inmovilización en una fase sólida, pozos de microtitulación, tubos, varillas de inmersión u otros medios convencionales. En la presente invención, el producto del gen o la expresión de genes es proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO: 9).
- En otro aspecto, la descripción incluye poner en contacto una muestra de tejido o una muestra de fluido corporal con un agente que detecta en un felino uno o más genes o el producto de expresión de dichos uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9) y proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); y, opcionalmente, un segundo grupo de al menos un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13); metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteínasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteínasa de la matriz-19 (MMP 19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16). El agente puede ser un anticuerpo o una sonda de ácido nucleico utilizada junto con medios del ensayo convencional tales como la inmovilización en una fase sólida, pozos de microtitulación, tubos, varillas de inmersión u otros medios convencionales. En la presente invención, el producto del gen o la expresión de genes es la proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO: 9).
- Otra realización del método de la invención abarca el uso de medios de ensayo convencionales para determinar la expresión de genes en un felino, ya sea solo o en combinación con exploraciones de matriz de expresión de genes que emplean polipéptidos y/o polinucleótidos, tales medios de ensayo convencional que comprenden uno o más de ELISA, RIA, ensayos de inmunotransferencia, hibridación in situ, análisis de transferencia Northern, análisis de transferencia Western y análisis de Luminex X-Map®.
- Un aspecto adicional de la descripción es que se relaciona con la identificación de nuevos biomarcadores de un trastorno renal en felinos, así como métodos de detección de un trastorno renal en dichos felinos basado en un patrón característico de la expresión de genes de tales biomarcadores in vivo. Específicamente, los métodos de la descripción comprenden detectar la expresión diferencial, en comparación con un nivel de expresión de control, de al menos un biomarcador, en una muestra corporal, preferiblemente una muestra de sangre, en donde la detección de la expresión diferencial de tales biomarcadores identifica específicamente a felinos que tienen glomerulonefritis. Por lo tanto, estos métodos se basan en la detección de al menos un biomarcador que se expresa diferencialmente en un felino que tiene un trastorno renal en comparación con las células de los animales normales o de control. Los biomarcadores son proteínas y/o ácidos nucleicos que se expresan diferencialmente en un felino que tiene o propensos a desarrollar un trastorno renal anormal, en particular un trastorno renal. En un aspecto el patrón de expresión de genes comprende al menos un transcrito de ARN o de su producto de traducción seleccionado de un grupo de al menos un gen o el producto de la traducción de dicho gen seleccionado del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9); proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13); metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteínasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteínasa de la matriz-19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16). En una realización preferida, el diferencial es al menos aproximadamente una desviación estándar alrededor de la media. En una realización más preferida, el diferencial es al menos aproximadamente un diferencial de 2 pliegues. En la presente invención, el producto del gen o la expresión de genes es la proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No: 9).
- Un aspecto adicional de la descripción es que se relaciona con la identificación de nuevos biomarcadores de un trastorno renal en felinos, así como métodos de detección de un trastorno renal en tales felinos basado en un patrón característico de la expresión de genes de tales biomarcadores in vivo. En concreto, los métodos comprenden la detección de la expresión diferencial, en comparación con un nivel de expresión de control, de al menos un

biomarcador, en una muestra corporal, preferiblemente una muestra de sangre, en donde la detección de la expresión diferencial de tales biomarcadores identifica específicamente a felinos que tienen glomerulonefritis. Por lo tanto, estos métodos se basan en la detección de al menos un biomarcador que se expresa diferencialmente en un felino que tiene un trastorno renal en comparación con las células de los animales normales o de control. Los biomarcadores son proteínas y/o ácidos nucleicos que se expresan diferencialmente en un felino que tiene o propensos a desarrollar un trastorno renal anormal, en particular un trastorno renal. En un aspecto el patrón de expresión de genes comprende al menos un transcrito de ARN o su producto de traducción seleccionado de un primer grupo de al menos un gen o el producto de la traducción de dicho gen seleccionado del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con Frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9) y proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); y, opcionalmente, un segundo grupo de al menos un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13); metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteínasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteínasa de la matriz-19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16). En un aspecto preferido, el diferencial es al menos aproximadamente una desviación estándar alrededor de la media. En una realización más preferida, el diferencial es al menos aproximadamente un diferencial de 2 pliegues. En la presente invención, el producto del gen o la expresión de genes es la proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO: 9).

Sin embargo, un aspecto adicional de la descripción se relaciona con: biomarcadores de glomerulonefritis en felinos que comprenden al menos un transcrito de ARN o de su producto de traducción seleccionado del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9); proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13); metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteínasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteínasa de la matriz-19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16). En otra realización, el biomarcador o biomarcadores se utilizan para detectar la glomerulonefritis. En una realización preferida, el biomarcador o biomarcadores anteriores se utilizan para diferenciar las fases de glomerulonefritis en un felino. En la presente invención, el producto del gen o la expresión de genes es la proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO: 9).

Sin embargo, un aspecto adicional de la descripción se relaciona con: biomarcadores de glomerulonefritis en felinos que comprenden al menos un transcrito de ARN o de su producto de traducción seleccionado del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9) y proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); y, opcionalmente, un segundo grupo de al menos un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13); metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteínasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteínasa de la matriz-19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16). En otro aspecto el biomarcador o biomarcadores se utilizan para detectar la glomerulonefritis. En un aspecto preferido, el biomarcador o biomarcadores anterior se utilizan para diferenciar las fases de glomerulonefritis en un felino. En la presente invención, el producto del gen o la expresión de genes es la proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO: 9).

En un aspecto adicional, la descripción se relaciona con composiciones que comprenden una o más sondas de ácido nucleico que hibridan específicamente con un ácido nucleico, o fragmento de la misma, que codifica un biomarcador de la presente invención seleccionado del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9); proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13); metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteínasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteínasa de la matriz-19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16). En la presente invención, el producto del gen o la expresión de genes es la proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO: 9).

5 En un aspecto adicional, la descripción se relaciona con composiciones que comprenden una o más sondas de ácido nucleico que hibridan específicamente con un ácido nucleico, o fragmento de la misma, que codifica un biomarcador de la presente invención seleccionada del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9) y proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); y, opcionalmente, un segundo grupo de al menos un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13); metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteínasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteínasa de la matriz-19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16). En la presente invención, el producto del gen o la expresión de genes es la proteína 2 secretada relacionada con Frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO: 9).

15 En un aspecto adicional, la descripción se relaciona con composiciones que comprenden anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido codificado por un gen que expresa un biomarcador de la presente invención seleccionado del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9); proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13); metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteínasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteínasa de la matriz-19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16). En la presente invención, el producto del gen o la expresión de genes es la proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO: 9).

30 En un aspecto adicional, la descripción se relaciona con composiciones que comprenden anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido codificado por un gen que expresa un biomarcador de la presente invención seleccionado del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9) y proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); y, opcionalmente, un segundo grupo de al menos un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13); metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteínasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteínasa de la matriz-19 (MMP 19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16). En la presente invención, el producto del gen o la expresión de genes es la proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO: 9).

40 Se contempla además en este documento que los métodos de la presente descripción se pueden utilizar en combinación con las técnicas tradicionales de diagnóstico que son capaces de detectar las características físicas y morfológicas de trastornos renales. Así, por ejemplo, la caracterización de la expresión diferencial en los genes para el riñón en células obtenidas de una muestras de tejido o muestras de líquido corporal de un felino se pueden combinar con las técnicas convencionales de diagnóstico (por ejemplo, radiológicos) con el fin de corroborar un diagnóstico de un trastorno renal en un felino, incluyendo, por ejemplo, la glomerulonefritis.

45 Un aspecto adicional de la descripción es un método para el diagnóstico y/o pronóstico de trastorno renal en un felino, en donde el método comprende las etapas de: obtener al menos una muestra de tejido o una muestra de líquido corporal del animal; determinar la cantidad del uno o más biomarcadores seleccionados de la Tabla 3 en dicha al menos una muestra o espécimen procedentes del animal, en donde dicho biomarcador es un polipéptido, proteína, ARN, ADN, polinucleótido o metabolito del mismo.

50 Incluso otro aspecto de la descripción es un kit para el diagnóstico y/o pronóstico de un trastorno renal en un felino, en particular para la realización del método para el diagnóstico y/o pronóstico de la glomerulonefritis en un felino en donde el método comprende las etapas de: obtener al menos una muestra de tejido o una muestra de líquido corporal del animal; determinar la cantidad del uno o más biomarcadores seleccionados de la Tabla 3 en dicha al menos una muestra o espécimen procedentes del animal, en donde dicho biomarcador es un polipéptido, proteína, ARN, ADN, polinucleótido o metabolito del mismo, y opcionalmente, que comprende además un detectable agente ligado a dicho biomarcador.

60 Todavía otro aspecto de la descripción es un reactivo para el diagnóstico y/o pronóstico de glomerulonefritis en un felino en particular para la realización del método para el diagnóstico y/o pronóstico de glomerulonefritis en un felino, en donde el método comprende las etapas de: obtener al menos una muestra de tejido o una muestra de líquido corporal del animal; determinar la cantidad del uno o más biomarcadores seleccionados de la Tabla 3, en dicha al

menos una muestra o espécimen procedente de un felino, en donde dicho biomarcador es un polipéptido, proteína, ARN, ADN, polinucleótido o metabolito del mismo, y que comprende opcionalmente además un agente detectable unido a dicho biomarcador.

5 Un aspecto adicional de la descripción es un método para el diagnóstico y/o pronóstico del trastorno renal en un felino, en donde el método comprende las etapas de: obtener al menos una muestra de tejido o una muestra de líquido corporal del animal; determinar la cantidad del uno o más biomarcadores seleccionados de las Tablas 3 y 4 en dicha al menos una muestra o espécimen procedentes del animal, en donde dicho biomarcador es un polipéptido, proteína, ARN, ADN, polinucleótido o metabolito del mismo.

10 Incluso otro aspecto de la descripción es un kit para el diagnóstico y/o pronóstico de un trastorno renal en un felino, en particular para la realización del método para el diagnóstico y/o pronóstico de la glomerulonefritis en un felino en donde el método comprende las etapas de: obtener al menos una muestra de tejido o una muestra de líquido corporal del animal; determinar la cantidad del uno o más biomarcadores seleccionados de las Tablas 3 y 4 en dicha al menos una muestra o espécimen procedentes del animal, en donde dicho biomarcador es un polipéptido, proteína, ARN, ADN, polinucleótido o metabolito del mismo, y opcionalmente, que comprende además un agente detectable unido a dicho biomarcador.

15 Todavía otro aspecto de la descripción es un reactivo para el diagnóstico y/o pronóstico de la glomerulonefritis en un felino en particular para la realización del método para el diagnóstico y/o pronóstico de la glomerulonefritis en un felino, en donde el método comprende las etapas de: obtener al menos una muestra de tejido o una muestra de líquido corporal del animal; determinar la cantidad del uno o más biomarcadores seleccionados de las Tablas 3 y 4 en dicha al menos una muestra o espécimen procedente de un felino, en donde dicho biomarcador es un polipéptido, proteína, ARN, ADN, polinucleótido o metabolito del mismo, y opcionalmente, que comprende además un agente detectable unido a dicho biomarcador.

20 Otro aspecto de la descripción es el uso de uno o más polipéptidos, proteínas, ARN, ADN, polinucleótidos o metabolitos de los mismos seleccionados del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9); proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13); metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteínasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteínasa de la matriz-19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16) como un biomarcador para el diagnóstico y/o pronóstico de glomerulonefritis, en particular para formar un kit para el diagnóstico o pronóstico de glomerulonefritis en un felino. En la presente invención, el uno o más polipéptidos, proteínas, ARN, ADN, polinucleótidos o metabolitos de los mismos, son proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO: 9).

25 Otro aspecto de la descripción es el uso de uno o más polipéptidos, proteínas, ARN, ADN, polinucleótidos o metabolitos de los mismos seleccionado del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9) y proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); y, opcionalmente, un segundo grupo de al menos un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13); metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteínasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteínasa de la matriz- 19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16) como un biomarcador para el diagnóstico y/o pronóstico de glomerulonefritis, en particular para formar un kit para el diagnóstico o pronóstico de glomerulonefritis en un felino. En la presente invención, el uno o más polipéptidos, proteínas, ARN, ADN, polinucleótidos o metabolitos de los mismos, son proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO: 9).

30 Otro aspecto de la descripción es el uso de uno o más polipéptidos, proteínas, ARN, ADN, polinucleótidos o metabolitos de los mismos seleccionado del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9); proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13); metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteínasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteínasa de la matriz-19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16) como un biomarcador para el diagnóstico y/o pronóstico de un trastorno renal, en particular para formar un kit para el diagnóstico o pronóstico de un trastorno renal en un felino. En la presente invención, el uno o más polipéptidos,

proteínas, ARN, ADN, polinucleótidos o metabolitos de los mismos, son proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO: 9).

- Otro aspecto de la descripción es el uso de uno o más polipéptidos, proteínas, ARN, ADN, polinucleótidos o metabolitos de los mismos seleccionados del grupo que consiste en: proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID NO. 9) y proteína 5 de unión al retinol (rbp5) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 10); y, opcionalmente, un segundo grupo de al menos un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: lumican (LUM) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 11); decorina (DCN) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 12); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 13); metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP2) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 14); metaloproteínasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 15); y metaloproteínasa de la matriz-19 (MMP19) o un homólogo de felino o fragmento de la misma (SEQ ID No. 16) como un biomarcador para el diagnóstico y/o pronóstico de un trastorno renal, en particular para formar un kit para el diagnóstico o pronóstico de un trastorno renal en un felino.
- Incluso otro aspecto es tal kit, en donde los reactivos y equipos comprenden materiales de análisis de micromatriz de ADN incluyendo micromatriz de oligonucleótidos, micromatriz ADNc, y chip de gen focalizado, o una combinación de los mismos.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. A lo largo de esta divulgación, diversos aspectos de esta invención pueden ser presentados en un formato de rango. Se debe entender que la descripción en formato de rango es meramente por conveniencia y brevedad, y no debe interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la invención. De acuerdo con lo anterior, la descripción de un rango se debe considerar que ha revelado específicamente todos los posibles subrangos, así como valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, la descripción de un rango tal como de 1 a 5 se debe considerar que se han descrito específicamente subrangos tales como de 1 a 3, de 1 a 4.

La práctica de la presente invención puede emplear, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales y descripciones de la química orgánica, tecnología de polímeros, biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), biología celular, bioquímica, e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas convencionales incluyen la síntesis de polímeros de matriz, hibridación, ligamiento, y detección de la hibridación utilizando una etiqueta. Ejemplos específicos de las técnicas apropiadas se pueden tener por referencia al ejemplo en este documento a continuación. Sin embargo, otros procedimientos convencionales equivalentes pueden, por supuesto, también se pueden utilizar. Tales técnicas y descripciones convencionales se pueden encontrar en los manuales estándar de laboratorio tales como: Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. 1-IV); Utilizando anticuerpos: A Laboratory Manual; Cells: A Laboratory Manual; Cebador PCR: A Laboratory Manual, and Molecular Cloning: A Laboratory Manual (todos de Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L. (1995) Biochemistry (4th Ed.) Freeman, New York; Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" 1984, IRL Press, London, Nelson and Cox (2000); Lehninger, Principles of Biochemistry 3rd Ed., W.H. Freeman Pub., New York, N.Y.; and Berg et al. (2002) Biochemistry, 5th Ed., W.H. Freeman Pub., New York, N.Y., todos los cuales se incorporan en este documento en su totalidad como referencia para todos los propósitos.

Las matrices de ácido nucleico que son útiles en la presente invención incluyen los que están disponibles comercialmente de Affymetrix (Santa Clara, Calif.) bajo la marca comercial GeneChip®. Ejemplos de matrices se muestran en el sitio web de Affymetrix. com.

La presente invención también contempla muchos usos para los polímeros unidos a sustratos sólidos. Estos usos incluyen el seguimiento de la expresión de genes, perfilado, análisis de bibliotecas, genotipado y diagnóstico. Seguimiento de la expresión de genes y métodos de perfiles se pueden mostrar en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,800,992, 6,013,449, 6,020,135, 6,033,860, 6,040,138, 6,177,248, 6,309,822 y 6,344,316. Genotipificación y usos, por lo tanto se muestran en U.S. Ser. No. 60/319,253, 10/013,598, y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,856,092, 6,300,063, 5,858,659, 6,284,460, 6,361,947, 6,368,799 y 6,333,179. Otros usos están incorporados en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,871,928, 5,902,723, 6,045,996, 5,541,061, y 6,197,506.

Los expertos en la técnica reconocerán que los productos y métodos incorporados en la presente invención se pueden aplicar a una variedad de sistemas, incluyendo sistemas de seguimiento de la expresión de genes disponibles comercialmente que implican matrices de sondas de ácido nucleico, transferencias de membrana, micropozos, perlas y tubos de muestra, construidos con diversos materiales, utilizando diversos métodos conocidos en la técnica. De acuerdo con lo anterior, la presente invención no se limita a ningún entorno particular, y la siguiente descripción de realizaciones específicas de la presente invención es sólo con fines ilustrativos.

El sistema de seguimiento de la expresión de genes, en una realización preferida, puede comprender una matriz de sondas de ácido nucleico (incluyendo una matriz de oligonucleótidos, una matriz de ADNc, una matriz de puntos, y similares), transferencia de membrana (tal como se utiliza en análisis de hibridación tales como Northern, Southern,

dot, y similares), o micropozos, tubos de muestra, perlas o fibras (o cualquier soporte sólido que comprende ácidos nucleicos unidos). Véanse las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,770,722, 5,744,305, 5,677,195, 5,445,934 y 6,040,193, que se incorporan en este documento por referencia. El sistema de seguimiento de la expresión de genes también puede comprender sondas de ácido nucleico en solución.

5 La presente invención también contempla la preparación de muestras que implica la amplificación. Una muestra genómica puede ser amplificada por una variedad de mecanismos, algunos de los cuales pueden emplear PCR. Véase, por ejemplo, Tecnología de PCR: Principios y Aplicaciones para la Amplificación de ADN (Ed. H. A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); Protocolos de PCR: A Guide to Methods and Applications (Eds. Innis, et al., Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Mattila et al., *Nucleic Acids Res.* 19, 4967 (1991); Eckert et al., *PCR Methods and Applications* 1, 17 (1991); PCR (Eds. McPherson et al., IRL Press, Oxford); y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,683,202, 4,683,195, 4,800,159, 4,965,188, y 5,333,675, y cada uno de los cuales se incorpora en este documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos. La muestra se puede amplificar en la matriz. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,300,070 y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Serie No. 09/513,300, que se incorporan en este documento por referencia.

15 Otros métodos de amplificación apropiados incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (por ejemplo, Wu and Wallace, *Genomics* 4, 560 (1989), Landegren et al., *Science* 241, 1077 (1988) y Barringer et al. *Gen* 89:117 (1990)), amplificación de la transcripción (Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1173 (1989) y WO88/10315), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87, 1874 (1990) y WO90/06995), amplificación selectiva de secuencias de polinucleótidos diana (Patente de los Estados Unidos No. 6,410,276),
 20 reacción en cadena de la polimerasa cebado de secuencia de consenso (CP-PCR) (Patente de los Estados Unidos No. 4,437,975), reacción en cadena de la polimerasa cebada arbitrariamente (AP-PCR) (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,413,909, 5,861,245) y amplificación de secuencias basada en ácidos nucleicos (NABSA). (Véanse, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,409,818, 5,554,517 y 6,063,603, cada una de las cuales se incorpora en este documento por referencia). Otros métodos de amplificación que pueden usarse se describen en, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,242,794, 5,494,810, 4,988,617, 6,344,316 cada una de las cuales se incorpora en este documento por referencia.

Los métodos adicionales de técnicas y preparación de muestras se describen en Dong et al., *Genome Research* 11, 1418 (2001), en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,361,947, 6,391,592 y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Serie. Nos. 09/916,135, 09/920,491, 09/910,292 y 10/013,598.

30 El sistema de seguimiento de la expresión de genes de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para facilitar un análisis comparativo de expresión en diferentes células o tejidos, diferentes subpoblaciones de las mismas células o tejidos, diferentes estados fisiológicos de las mismas células o tejidos, distintas etapas de desarrollo de las mismas células o tejidos, o diferentes poblaciones de células del mismo tejido. En una realización preferida, los métodos de amplificación proporcional de la presente invención pueden proporcionar resultados reproducibles (esto es, dentro de unos márgenes estadísticamente significativos de error o grados de confianza)
 35 suficiente para facilitar la medición diferencias cuantitativas, así como cualitativas en las muestras ensayadas.

Los ensayos de hibridación de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica. Los procedimientos y las condiciones de ensayo de hibridación pueden variar dependiendo de la aplicación y se seleccionan de acuerdo con los métodos de unión generales conocidos incluyendo los mencionados en: Maniatis et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Ed. Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); Berger and Kimmel *Methods in Enzymology*, Vol. 152, *Guide to Molecular Cloning Techniques* (Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1987); Young and Davis, *P.N.A.S.*, 80: 1194 (1983). Métodos y aparatos para llevar a cabo reacciones de hibridación repetida y controlados han sido descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,871,928, 5,974,219, 6,045,996, 6,386,749 y 6,391,623 cada una de las cuales se incorporan en este documento como referencia. La detección de la señal de hibridación entre
 45 ligandos en ciertas realizaciones preferidas. Véanse las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,143,854, 5,578,832, 5,631,734, 5,834,758, 5,936,324, 5,981,956, 6,025,601, 6,141,096, 6,185,030, 6,201,639, 6,218,803 y 6,225,625, en la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos 60/364,731 y en la Solicitud PCT PCT/US99/06097 (publicado como WO99/47964), cada uno de los cuales también se incorpora por referencia en su totalidad para todos los propósitos. Métodos y aparatos para la detección de señal y el tratamiento de los datos de intensidad se revelan en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,143,854, 5,547,839, 5,578,832, 5,631,734, 5,800,992, 5,934,758; 5,856,092, 5,902,723, 5,936,324, 5,981,956, 6,025,601, 6,090,555, 6,141,096, 6,185,030, 6,201,639; 6,218,803; y 6,225,625, en la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos 60/364,731 y en la Solicitud PCT PCT/US99/06097 (publicada como WO99/47964), cada uno de los cuales también se incorpora en este documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

55 La invención no se limita a la metodología particular, protocolos y reactivos descritos en este documento, ya que pueden variar. Además, la terminología usada en este documento es para el propósito de describir solamente realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención.

Todas las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones y otras referencias citadas o mencionadas en este documento se incorporan al presente por referencia en la medida permitida por la ley. La discusión de estas

referencias pretende limitarse a resumir las afirmaciones hechas en el mismo. No se hace admisión de que cualquiera de esas patentes, solicitudes de patentes, publicaciones o referencias, o cualquier parte del mismo, es la técnica pertinente para la presente invención y el derecho de cuestionar la exactitud y pertinencia de dichas patentes, solicitudes de patentes, publicaciones y otras referencias está reservado específicamente.

- 5 Como se utiliza hasta el final, los rangos se utilizan como una forma abreviada para describir todos y cada valor que está dentro del rango. Cualquier valor dentro del rango se puede seleccionar como el terminal del rango. Además, todas las referencias citadas en este documento se incorporan por referencia en su totalidad. En el caso de un conflicto en una definición en la presente divulgación y la de una referencia citada, la presente divulgación controla.

Ejemplos

- 10 **Ejemplo 1:** Clasificación de los felinos con enfermedad renal crónica de acuerdo con las directrices de la Sociedad Internacional renal interés.

En los ejemplos que siguen, los felinos que presentan signos clínicos de la enfermedad renal crónica se evaluaron frente a los animales que no presentan signos ni síntomas de la enfermedad renal crónica. Los diagnósticos patológicos de la enfermedad renal crónica se hicieron en base a los criterios establecidos en las Tablas 1 y 2 a 15 continuación y de acuerdo con las directrices de la Sociedad Internacional de interés renal (IRIS).

La estadificación de la enfermedad renal crónica (CDK) se lleva a cabo tras el diagnóstico de CDK con el fin de facilitar el tratamiento y seguimiento apropiado del sujeto animal. La estadificación se basa inicialmente en la creatinina en plasma en ayunas, evaluado en al menos dos ocasiones en el animal estable. Los felinos que muestran una función renal normal y sin signos clínicos o síntomas de CKD se agruparon como felinos sin enfermedad. La etapa 1 en los felinos corresponde a las clasificaciones anteriores de la enfermedad renal temprana sin evidencia bioquímica de CDK a insuficiencia renal, donde se detecta ninguna azotemia, pero donde la medición de la filtración glomerular (GFR) se puede reducir y puede haber una pobre capacidad de concentración de los riñones. Etapa 2 corresponde a la clasificación anterior de la insuficiencia renal temprana. En la etapa 2, se observa azotemia leve. Etapa 3 corresponde a la clasificación anterior de la insuficiencia renal urémica, donde se detecta azotemia moderada. Los signos sistémicos de insuficiencia renal urémica pueden estar presentes tales como dolor de huesos, gastritis urémica, anemia y acidosis metabólica. Etapa 4 corresponde a insuficiencia renal terminal, que se caracteriza por azotemia grave y aumento de los signos clínicos sistémicos de la crisis urémica.

La Tabla 1 identifica las cinco categorías de los felinos estudiados, respectivamente. Se estudiaron un total de 42 felinos diagnosticados como que no tienen CDK. Un total de 14 felinos de la etapa 1 exhibió glomerulonefritis mínima (GN). El número de felinos estudiado que mostró estadios avanzados de CDK fue: Etapa 2 GN leve = 24; Etapa 3 GN moderada = 8 y Etapa 4 GN marcada = 13. Los niveles plasmáticos de creatinina para cada uno de los grupos de felinos se muestran en la Tabla 2 como niveles de la media y la mediana de creatinina en plasma para cada grupo de felinos.

Tabla 1: Estadificación de los felinos

Estadificación IRIS de CDK	Rango de creatinina en plasma mg/dl
Sin enfermedad	<1.6 con ninguna evidencia firme de la enfermedad
Etapa 1	<1.6 (<140 µmol/l) con evidencia de enfermedad. No azotémico. Algunas otras anomalías renales presentes (por ejemplo, la capacidad de concentración inadecuada sin causa identificable no renal; palpación renal anormal y/o hallazgos de imágenes renales; proteinuria de origen renal; biopsia renal anormal
Etapa 2	1.6 a 2.8 (140-249 µmol/l) Azotemia renal leve. Signos clínicos habituales leves o ausentes.
Etapa 3	2.9 a 5.0 (250-439 µmol/l) Azotemia renal moderada. Muchos signos clínicos pueden estar presentes.

35

Estadificación IRIS de CDK	Rango de creatinina en plasma mg/dl
Etapa 4	>5.0 (>440 $\mu\text{mol/l}$) Azotemia renal grave. Muchos signos clínicos extrarrenales presentes.

Tabla 2: Niveles de creatinina en plasma

Diagnóstico patológico	Media de creatinina en plasma mg/dl	Mediana de creatinina en plasma mg/dl
Sin enfermedad (n = 15)	1.3	1.0
GN mínima (n = 4)	1.4	1.5
GN leve (n = 10)	2.4	1.8
GN Moderada (n = 20)	3.8	2.6
GN Marcada (n = 13)	7.1	7.1

5 **Ejemplo 2:** Criterios de selección de candidatos.

En los ejemplos que siguen a la presentación de informes sobre los felinos para el cual los datos de expresión de genes se obtuvo mediante el análisis de micromatriz de ADN, se establecieron los criterios de selección con el fin de identificar ciertos genes y proteínas expresadas como marcadores biológicos apropiados de la enfermedad renal crónica, y, en consecuencia, la glomerulonefritis. Con el fin de ser identificado como un marcador biológicamente significativo de CDK, se determinó el perfil de expresión de genes para exigir que: (1) el gen sea una proteína excretada; (2) debe haber un nivel de expresión diferencial entre animales normales evidenciando sin signos clínicos o síntomas de glomerulonefritis y animales que acrediten signos mínimo, leve, moderado o marcado (Etapa 1 a 4, respectivamente) de CKD de al menos 2 pliegues (expresión inducida o inhibida); (3) los niveles de expresión de genes se deben correlacionar con la progresión de la enfermedad de mínima a leve, moderada y marcada (Etapas 1 a 4); y (4) hay al menos una desviación estándar alrededor de la media entre los animales sin enfermedad y los animales moderados. El criterio de selección de este último se basa en la observación de que los chips de genes de micromatriz son dispositivos semicuantitativos y que análisis de múltiples matrices (RMA) robustos a escala logarítmica se utilizan para la normalización de los datos.

Un trabajador experto puede seleccionar entre una serie de algoritmos para el análisis de datos del chip de genes. Estos incluyen algoritmo estadístico MASS, la sonda de estimación de error de intensidad logarítmica (PLIER) y el análisis multi-chip robusto (RMA). Los algoritmos de procesamiento se discuten en detalle en las siguientes referencias: Li, C. Mo, 2001, Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection, Proc. Acad. Sci., Vol. 98:31-36; Irizarry R.A. et al., Exploration, normalization and summaries of high density oligonucleotide array probe level data, Biostatistics, 2003, Vol. 4:249-264; Irizarry et al., Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data, Nucleic Acid Res., 2003, Vol. 31(4): e15; and Fan, W., A et al., A class f models for analyzing GeneChip gene expression analysis array data, BMC Genomics, 2005, Vol. 16: 6-16; Zhou, L et al., An expression index for Affymetrix GeneChips based on the generalized logarithm, Bioinformatics, 2005, Vol. 21(21): 3983-3989 and Hein A.K. et al., BGX: a fully Bayesian integrated approach to the analysis of Affymetrix GeneChip data, Biostatistics, 2005, Vol. 6: 349-373.

Los datos en bruto en los siguientes ejemplos se analizaron utilizando el software GeneSpring version 7.0 (GS) (Agilent Corporation) y se validaron utilizando el software de distribución libre R-Bioconductor (RB). Ambos paquetes de software se utilizan para calcular intensidades de la sonda de los archivos CEL generados por el instrumento Affymetrix. Las llamadas Ausente/Presente/marginal por sonda y los valores-p se calcularon utilizando el software R-Bioconductor y GeneSpring por separado.

Se determina que los datos de expresión de genes son ya sea de expresión "inducida" o "inhibida" para cualquier análisis dado. La decisión de si un gen está "inducido" o "inhibido" se basa en el nivel de cambio, que se calcula como la intensidad del tratamiento/intensidad control para cada sonda individual. El nivel de cambio se considera de expresión inhibida si su valor es $<1/2$ y es inducida si es > 2.0 . También, una sonda se considera significativa para

un examen más detallado si se llama como presente en sólo una de las condiciones que se comparan (tratamiento o control) y es "ausente" o "marginal" en la otra y el nivel de cambio es significativo de acuerdo con el software utilizado.

Ejemplo 3: Procedimientos de aislamiento de ARN.

- 5 Materiales y Métodos. Los siguientes procedimientos generales se pueden utilizar para aislar el ARN de muestras de tejidos de felinos y felinos para perfiles de expresión de genes que utilizan chips de genes, como se describe adicionalmente en los Ejemplos de esta descripción. Será evidente para una persona de experiencia ordinaria en el arte que estos procedimientos o modificaciones de la misma, como se reconoce en la técnica, se puede aplicar para aislar ARN a partir de muestras de tejido o de líquido corporal para el análisis adicional de expresión de genes
10 utilizando una variedad de procedimientos analíticos disponibles para una persona de experiencia ordinaria en el arte, en particular, tecnologías de micromatriz.

- 15 El aislamiento de ácido ribonucleico (ARN) a partir de tejido. Las muestras de tejido pueden ser recogidas, congelar en nitrógeno líquido, descongelar y, a continuación, se molieron con un mortero y mano de mortero, se homogeneizaron y transfirieron a un matraz cónico de 50 mL. La muestra de tejido homogeneizado se procesa a continuación, utilizando un método de extracción de ARN TRIzol® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen) para producir ARN de buena calidad que después se somete a un análisis genómico más detallado.

Materiales: hielo, nitrógeno líquido, tejido felino congelado, reactivo de lisis TRIzol®, cloroformo mínimo de 99%, alcohol isopropílico, etanol al 70% (preparado con etanol, absoluta y desionizado, agua libre de RNasa), RNasa Zap®, agua desionizada, RNA Storage Solution®, de Ambion.

- 20 Equipo: Ultra-Turrax T25 Potencia Homogeneizador, centrífuga Beckman Coulter Allegra 25R, centrífuga Eppendorf, fórceps, escalpelos, superficie de corte duro, esto es, tabla de cortar, tubos de microcentrífuga estériles/libres de RNasa DNasa de 1.5 mL, tubos de polipropileno estériles desechables/libres de DNasa y RNasa de 50 mL, pipetas P1000, P200, P20, P10 y P2 Rainin Pipetman, puntas de pipeta de filtro para pipetas P1000, P200, P20, P10 y P2, estériles/libres de DNasa y RNasa, y toallitas libres de pelusas.

- 25 Preparaciones: Preparar tubos de polipropileno de 50 mL con 4 mL de TRIzol® (un tubo para cada tejido seleccionado para el aislamiento de ARN).

- 30 Homogeneización de tejidos: Llenar un recipiente capaz de contener nitrógeno líquido con 3-4 cucharadas de nitrógeno líquido. Colocar un pedazo de tejido congelado de inmediato en el recipiente antes mencionado (el tejido debe ser aproximadamente del tamaño de un guisante) y colocar el tejido en el tubo de polipropileno 50 mL marcado apropiado (que ya contiene 4 mL de TRIzol®). Comenzar inmediatamente la homogeneización utilizando el homogeneizador Ultra-Turrax T25 Power. Homogeneizar a la máxima configuración (6) durante 10-15 segundos. Enfriar la muestra en hielo durante otros 10-15 segundos y a continuación repetir. Continuar hasta que el tejido sea totalmente homogeneizado y la solución está turbia. Tras completar la homogeneización, la tapa del tubo de 50 mL y volver al hielo. Incubar los tejidos homogeneizados a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de proceder con el procedimiento de aislamiento.
35

Ejemplo 4: Procedimientos de preparación de ARN.

- Aislamiento de ARN: Los procedimientos indicados en las instrucciones de Invitrogen proporcionadas con el reactivo TRIzol® se siguió de manera general. Separar la muestra homogeneizada en cuatro alícuotas de 1 mL en cuatro tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Adicionar 200uL de cloroformo a cada alícuota de 1 mL. Tapar los tubos,
40 someterlos a vortex durante 15 segundos y después agitar hacia arriba y abajo. El resultado debe ser un líquido lechoso de color rosa. Incubar los tubos a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Centrifugar los tubos durante 15 minutos a 14,000 rpm y 4°C. Transferir la fase acuosa (capa superior) a un tubo de microcentrífuga de 1.54 mL. El volumen típico de la fase acuosa que debe ser transferido al nuevo tubo es aproximadamente 500 uL. Asegúrese de no transferir cualquiera de las fases intermedias o inferiores. Precipitar el ARN a partir de solución mediante la adición de 500 uL de alcohol isopropílico a cada tubo de microcentrífuga que contiene la capa acuosa. Agitar los tubos de arriba a abajo durante al menos 20 segundos. Incubar las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos. Centrifugar las muestras durante 10 minutos, 14,000 rpm a 4°C. Eliminar el sobrenadante cuidadosamente aspirando el líquido asegurándose de no perder el pellet. Adicionar 1 mL de etanol al 70% para lavar el pellet. Desalojar el pellet con un movimiento rápido del tubo (o dando golpecitos al tubo en la mesa de trabajo) y agitar para
45 mezclar. Centrifugar durante 5 minutos, 8,200 rpm a 4°C. Eliminar el sobrenadante cuidadosamente aspirando el líquido asegurándose de no perder el pellet. Utilizando una toallita sin pelusa para absorber el exceso de etanol con cuidado para asegurarse de que el pellet está seca. Volver a suspender cada pellet en 30 uL de solución de almacenamiento de ARN. Mezclar suavemente con la pipeta hasta que el ARN regresa a la solución y luego almacenar a -80 °C. Puede ser necesario someter al vórtex la muestra durante unos pocos segundos a baja
50 velocidad para facilitar la resuspensión del ARN. Si es necesario, centrifugar las muestras, utilizando la microcentrífuga, antes de la congelación.
55

ES 2 590 263 T3

Limpieza del ARN: Se siguen los procedimientos expuestos en el Manual RNeasy® Mini.

Aislamiento del ARN de las células cultivadas en cámaras OptiCell utilizando el Kit RNeasy Mini. Las células cultivadas a partir de líneas celulares de mamíferos se utilizan para aislar ARN de buena calidad que se usa entonces para el futuro análisis genómico en dirección 3'. Cualquier trabajo relacionado con el cultivo de las células que se debe hacer bajo estrictas condiciones de asepsia.

Reactivos: 10X de PBS, H₂O desionizada, etanol absoluto, solución de almacenamiento de ARN, (β -mercaptoetanol, RNasa Zap®, solución reguladora RLT y solución reguladora RW1 y solución reguladora RPE (proporcionado en el kit RNeasy Mini).

Equipos/Materiales: Kit RNeasy Mini, columnas de centrifugación Qias shredder, cuchillo OptiCell, jeringas estériles de 20 mL, puntas de pipeta OptiCell, recogedor de células, pipeta P1000 Pipetman, Rainin, pipeta P200 Pipetman, Rainin, puntas de pipeta filtrada de 100-100 uL, puntas de pipeta filtrada de 1-200 uL, pipetas de transferencia estériles, cubeta de solución estéril de 55 mL, tubos estériles para microcentrífuga de 1.5 mL, y Eppendorf microcentrífuga.

Soluciones: solución reguladora RLT (solución stock proporcionada en Kit RNeasy Mini); -Adicionar 100 uL de (β -mercaptoetanol por 10 mL de solución reguladora RLT antes de comenzar el protocolo. Etanol al 70%: Hacer 50 mL de etanol al 70% mediante la adición de 35 mL de etanol absoluto a 15 mL de desionizada, agua libre de RNasa 1X PBS: agua libre de RNasa. Filtrar la solución utilizando un filtro de .22 μ m.

Procedimiento: Remover las células de la cámara OptiCell (pasar una OptiCell a la vez). Comprobar las células bajo un microscopio para asegurar que las células están vivas antes de aislar el ARN. Retirar y desechar el medio de cultivo celular. Utilizando el cuchillo OptiCell, cortar la membrana superior mostrando las células en la membrana inferior. Lavar la membrana a la que las células se unen tres veces con 1X PBS. Pipetear 600 uL de la solución reguladora RLT (que contiene β -mercaptoetanol) en el centro de la membrana a la que se unen las células. Utilizando el recogedor de células, se extiende suavemente la solución reguladora RLT sobre toda la superficie de la membrana, y luego se recoge el líquido en una esquina. Pipetear la totalidad del volumen de la solución reguladora RLT y colocar en una columna de centrifugación QIA shredder.

Aislamiento de ARN: Centrifugar las columnas de centrifugación QIA shredder a 14,000 rpm durante 2 minutos. Descartar la columna de centrifugación, pero mantener el tubo de recolección y su contenido. Adicionar 600 uL de etanol al 70% al tubo de recolección y se mezcla bien con la pipeta (volumen total ahora = 1.2 mL). Transferir 600 uL del lisado celular a una columna RNeasy mini y centrifugar durante 15 segundos a 14,000 rpm. Descartar el flujo a través, pero mantener el tubo de recolección y la columna de centrifugación. Transferir el volumen restante de lisado de células (~600 uL) a la columna de centrifugación y repetir la centrifugación. Descartar el flujo a través, pero mantener el tubo de recolección y la columna de centrifugación. Adicionar 700 uL de solución reguladora RW1 a la columna de centrifugación. Centrifugar durante 15 segundos a 14,000 rpm para lavar la columna. Descartar el flujo a través y el tubo de recolección. Transferir la columna de centrifugación a un nuevo tubo de recolección de 2 mL y adicionar 500 uL de solución reguladora RPE a la columna. Centrifugar durante 15 segundos a 14,000 rpm. Descartar el flujo a través, mantener el tubo de recolección/columna. Adicionar otros 500 uL de solución reguladora RPE a la columna. Centrifugar durante 2 minutos a 14,000 rpm. Transferir la columna de centrifugación a un tubo de recolección de 1.5 mL. Adicionar 30 uL de solución de almacenamiento de ARN directamente a la membrana de sílica gel y se centrifuga durante 1 minuto a 14,000 rpm para eluir el ARN. Almacenar el final de ARN a -70°C.

Ensayo RNA 6000 Nano. Utilizando el Agilent 2100 Bioanalyzer y Ensayo RNA 6000 Nano, analizar el ARN aislado de cultivos de células de mamíferos, linfocitos o tejidos de calidad.

Reactivos: matriz de gel RNA 6000 Nano, concentrado de tinte RNA 6000 Nano, Marcador RNA 6000 Nano, (todos los reactivos anteriores están contenidos en el Kit de Ensayo RNA 6000 Nano, Agilent), RNA 6000 ladder, RNase Zap, y agua libre de RNasa, de Ambion.

Equipos/Otros Materiales: Estación Agilent Chip Priming, Agilent, RNA 6000 chip, Agilent, limpiadores de electrodos, pipetas P2, P10, P200 y P1000 Rainin Pipetman, puntas de pipeta filtradas, libres de DNasa/RNasa, estériles, tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, estériles, vortex, mezclador vortex IKA, microcentrífuga, y bloque de calentamiento.

Procedimiento: El procedimiento se da en la Guía de kit de reactivos, ensayo RNA 6000 Nano, edición de noviembre de 2003, de Agilent Technologies. Los procedimientos se siguen como se indica en la Guía, con las siguientes modificaciones: Preparación del gel, pg. 17- en lugar de separar el gel filtrado en alícuotas de 65 uL cada una, mantener el gel filtrado stock en el tubo de microcentrífuga original y la alícuota de 65 uL según sea necesario. Cargar el marcador RNA 6000 Nano, pg. 22- adicionar 1 uL de agua libre de RNasa (en lugar de marcador RNA 6000 Nano) a cada pozo de muestra que no contiene muestra. Esto no sólo conserva la cantidad de marcador usado sino que también sirve como un control negativo para ver que ninguno de los reactivos está contaminado, incluyendo el agua libre de RNasa. Cargar la escalera y muestras, pg. 23-calor desnatura las muestras y ARN 6000 Ladder

por 30 segundos adicionales (total de 2.5 minutos) a 71°C. A partir del Chip Run, pg. 26- elegir la opción " Eukaryote Total RNA Nano" en el menú de ensayo.

Ejemplo 5: Análisis de expresión de Affymetrix GeneChip.

5 La expresión de genes se analizó utilizando un *Affymetrix Felino GeneChip*® patentado. El ARN total se transcribió de forma inversa en ADNc. El ADNc se utiliza para generar ARNc que es fragmentado y utilizado como sondas para la hibridación GeneChip. El chip de gen se lava y la señal de hibridación se mide con un escáner de láser Affymetrix. Los datos de la hibridación entonces son validados y normalizados para el análisis adicional de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 Equipo: Eppendorf microcentrífuga, tubos de microcentrífuga estériles/libres de DNasa y RNasa de 1.5 mL, tubos de polipropileno estériles/desechables/libres de DNasa y RNasa de 50 mL, pipetas P1000, P200, P20, P10 y P2 Rainin Pipetman, puntas de pipeta de filtro para pipetas P1000, P200, P20, P10 y P2, estériles/libres de DNasa y RNasa, y Peltier Thermal Cycler PTC-200.

15 Procedimiento: seguir todos los procedimientos tal y como se describe en el Manual GeneChip Expression Analysis Technical (Affymetrix Derechos de Autor 1999-2003). Usar 5 microgramos de ARN total para la síntesis de ADNc de la primera cadena. Utilizar cualquiera Peltier Thermal Cycler PTC-200 o bloque de calentamiento para controlar la temperatura sobre las reacciones y desnaturalización de la sonda. El control de calidad se realiza utilizando chips de RNA NanoDrop con BioAnalyser 2100. Usar 100 Formato (Midi Array) para el chip del gen de felino.

Ejemplo 6: Expresión génica en felinos con insuficiencia renal crónica

20 Los estudios se llevaron a cabo de acuerdo con los ejemplos 1-5 anteriores utilizando los felinos que tienen diversas etapas de la enfermedad renal crónica para determinar las diferencias subyacentes de expresión de genes entre los felinos con función renal normal y felinos que tienen glomerulonefritis mínima, leve, moderada y marcada correspondiente a Etapas 1 a 4 como se presentan en la Tabla 1. Los procedimientos como se describen en los ejemplos de esta descripción se utilizaron para preparar muestras de tejido y líquido corporal a partir de 15 felinos que tienen función renal normal, 4 felinos que tienen un mínimo de glomerulonefritis, 10 felinos que tiene glomerulonefritis leve, 20 felinos que tienen glomerulonefritis moderada y 13 felinos que tienen glomerulonefritis marcada, según se determina por los niveles de creatinina en plasma presentados en la Tabla 2 y por la observación clínica.

30 Basándose en los datos de expresión de genes comparando los felinos con función renal normal frente a los felinos que tienen glomerulonefritis, como se define en los ejemplos anteriores, los cuatro genes que figuran en la Tabla 3 fueron identificados como que cumplen los criterios de selección del Ejemplo 2 como biomarcadores potenciales de trastornos renales crónicos en los felinos. Los genes incluyen lumican (LUM), cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1), decorina (DCN), y proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2). Sinónimos humanos Análogos y ARNm y números de acceso de proteínas se enumeran en la Tabla 3 para cada gen. Cada una de las proteínas es una proteína secretada. Los datos de nivel de cambio geométrico, representados frente a la etapa de la glomerulonefritis para cada uno de los cinco genes se presentan en las Figuras 1 a 4, respectivamente.

35 La Fig. 1a demuestra un nivel de cambio la media geométrica de 10 en felinos que tienen glomerulonefritis marcada sobre felinos normales para el producto de la expresión de genes lumican. La figura 1b presenta los datos de intensidad RMA de media geométrica representada frente a la etapa de la glomerulonefritis para cada uno de los animales ensayados.

40 Fig. 2a demuestra un nivel de cambio de la media geométrica de 10 en felinos que tienen glomerulonefritis marcada sobre felinos normales para el producto de la expresión de genes COL3A 1. La figura 2b presenta los datos de intensidad de RMA de media geométrica representada frente a la etapa de la glomerulonefritis para cada uno de los animales ensayados.

45 Fig. 3a demuestra un nivel de cambio de media geométrica de 4.3 en los felinos que tienen glomerulonefritis marcada sobre felinos normales para el producto de expresión de genes de decorina. La figura 3b presenta los datos de intensidad RMA de la media geométrica representada frente a la etapa de la glomerulonefritis para cada uno de los animales ensayados.

50 Fig. 4a demuestra un nivel de cambio de la media geométrica de 3.8 en los felinos que tienen glomerulonefritis marcada sobre felinos normales para el producto de la expresión de genes SFRP2. La figura 4b presenta los datos de intensidad RMA de la media geométrica representada frente a la etapa de la glomerulonefritis para cada uno de los animales ensayados.

Fig. 5a demuestra un nivel de cambio de la media geométrica de 10.3 en los felinos que tienen glomerulonefritis marcada sobre felinos normales para el producto de la expresión de genes de metaloproteinasas de la matriz -2. La

figura 5b presenta los datos de intensidad RMA de la media geométrica representados frente a la etapa de la glomerulonefritis para cada uno de los animales ensayados.

5 Fig. 6a demuestra un nivel de cambio de la media geométrica de 23 en los felinos que tienen glomerulonefritis marcada sobre felinos normales para el producto de expresión de genes de metaloproteinasa de la matriz-7. La figura 6b presenta los datos de intensidad RMA de la media geométrica representados frente a la etapa de la glomerulonefritis para cada uno de los animales ensayados.

10 Fig. 7a demuestra un nivel de cambio de la media geométrica de 6.9 en los felinos que tienen glomerulonefritis marcada sobre felinos normales para el producto de la expresión de genes de metaloproteinasas de matriz-19. La figura 7b presenta los datos de intensidad RMA de la media geométrica representados frente a la etapa de glomerulonefritis para cada uno de los animales ensayados.

Fig. 8a demuestra un nivel de cambio de la media geométrica de 3.9 expresión inducida en los felinos que tienen glomerulonefritis marcada sobre felinos normales del producto de expresión de genes de la proteína 5 de unión al retinol. La figura 8b presenta los datos de intensidad RMA de la media geométrica representados frente a la etapa de la glomerulonefritis para cada uno de los animales ensayados.

15 Aunque cualquiera de las composiciones, métodos, artículos de fabricación, u otros medios o materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento se pueden utilizar en la práctica de la presente invención, las composiciones preferidas, los métodos, artículos de fabricación, o por otros medios o materiales se describen en este documento.

En particular, la invención como se describe en este documento provee las siguientes realizaciones:

20 1. Un método de diagnóstico de la existencia de un trastorno renal en un felino que comprende medir el nivel de expresión del uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en lumican; cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12; decorina; proteína 2 secretada relacionada con frizzled; proteína 5 de unión al retinol; MMP-2; MMP-7; y MMP-19, en una muestra biológica del felino, en donde las diferencias en expresión del uno o más biomarcadores en la muestra con relación a un valor de control para la expresión en una muestra de un animal normal indican la existencia de un trastorno renal.

25 2. El método de la cláusula 1, que comprende la detección de niveles de expresión de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) y/o proteína 5 de unión al retinol (rbp5) y, opcionalmente, niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: lumican (LUM); decorina (DCN); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1)); metaloproteinasa de la matriz-2 (MMP2); metaloproteinasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1); y metaloproteinasa de la matriz-19 (MMP 19).

35 3. El método de la cláusula 1 o la cláusula 2, en donde el nivel de expresión del uno o más biomarcadores se determina mediante la medición de la expresión de genes del uno o más biomarcadores utilizando ya sea (i) una micromatriz de ADN que comprende uno o más oligonucleótidos complementarias a ARNm o ADNc correspondiente a los uno o más biomarcadores que se va a medir, o (ii) una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con cebadores de oligonucleótidos para ARNm o ADNc correspondientes a los uno o más biomarcadores que se van a medir.

40 4. El método de la cláusula 3, en donde la etapa de medición de la expresión de genes del uno o más biomarcadores comprende (i) aislar el ARN de la muestra de tejido, (ii) transcripción inversa del ARN para obtener el ADNc correspondiente, (iii) aislar y fragmentar el ADNc así obtenido, (iv) poner en contacto los fragmentos de ADNc con una micromatriz de ADN que comprende uno o más oligonucleótidos complementarios a ADNc correspondientes a los uno o más biomarcadores que se van a medir, y (v) detectar la hibridación entre los fragmentos de ADNc y los uno o más oligonucleótidos en la micromatriz de ADN.

5. El método de la cláusula 4, en donde los oligonucleótidos en la micromatriz de ADN comprenden una o más sondas capaces de hibridarse a una o más de SEQ ID NOS. 9-16.

45 6. El método de la cláusula 5, en donde los oligonucleótidos en la micromatriz de ADN comprenden una o más sondas que comprenden secuencias seleccionadas de una o más de SEQ ID NOS. 1-8.

7. El método de cualquier cláusula anterior, en donde el nivel de expresión del biomarcador se detecta por un anticuerpo a la proteína expresada.

50 8. El método de la cláusula 7, en donde el biomarcador se detecta mediante un inmunoensayo seleccionado de un ensayo de unión competitiva, un ensayo de unión no competitiva, un radioinmunoensayo, un ensayo inmunoabsorbente con enzima ligada (ELISA), un ensayo de tipo sándwich, una reacción de precipitina, un ensayo de inmunodifusión de difusión en gel, un ensayo de aglutinación, un inmunoensayo fluorescente, inmunoensayo de

quimioluminiscencia, inmunoensayo immunoPCR, un inmunoensayo de proteína A o proteína G y un ensayo de inmunoelectroforesis.

9. El método de una cualquiera de las cláusulas 1-6, en donde el nivel de expresión del biomarcador se detecta midiendo la cantidad de proteína en la muestra utilizando espectroscopia de masas cuantitativo.
- 5 10. El método de una cualquiera de las cláusulas 1-6, en donde el nivel de expresión del biomarcador se detecta por un aptámero que reconoce la proteína expresada.
11. El método de cualquiera cláusula anterior, en donde la muestra biológica es sangre o una muestra de tejido renal.
- 10 12. El método de cualquiera cláusula anterior que comprende detectar los niveles de expresión de proteína 2 secretada relacionada con frizzled(SFRP2) y/o proteína 5 de unión al retinol (rbp5).
- 15 13. El método de cualquiera cláusula anterior, en donde el felino tiene la función renal esencialmente normal, tal como se mide mediante uno o más de los siguientes: medición normal de la filtración glomerular, medición de depuración de creatinina, niveles de proteína en orina, niveles de creatinina en suero, niveles de creatinina urinaria, niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN), marcación metabólica con radioisótopos, obtención de imágenes de tejidos blandos, incluyendo ecografía, exploración de resonancia magnética y/o tomografía computarizada.
14. El método de cualquiera cláusula anterior, en donde el trastorno renal es un trastorno caracterizado por una pérdida anormal de función renal, insuficiencia renal, medición de la filtración glomerular reducida o glomerulonefritis.
15. El método de cualquier cláusula anterior, en donde el trastorno renal es glomerulonefritis.
- 20 16. El método de cualquiera cláusula anterior, en donde la existencia de un trastorno renal está indicada por una diferencia significativa en la expresión de uno o más de los siguientes en relación con los valores de control de expresión en donde una "diferencia significativa" en el caso de aumento de la expresión es un aumento de al menos dos veces y en el caso de disminución de expresión es una disminución de al menos 50%:
- a. Incremento de la expresaión de lumican;
- 25 b. Incremento de la expresión de la cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12;
- c. Incremento de la expresión de la decorina;
- d. Incremento de la expresión de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled;
- e. Expresión de la proteína 5 de unión al retinol reducida;
- f. Incremento de la expresión de MMP-2;
- 30 g. Incremento de la expresión de MMP-7; y/o
- h. Incremento de la expresión de MMP-19.
17. Un método para tratar, mejorar, o retrasar la progresión de un trastorno renal caracterizado por una pérdida anormal de la función renal, insuficiencia renal, medición de la filtración glomerular reducida o glomerulonefritis en un felino, que comprenden el diagnóstico de la existencia de un trastorno renal por el método de cualquier cláusula anterior y la gestión del trastorno por dieta y/o medicación de protección del riñón.
- 35 18. El método de la cláusula 17, en donde la etapa de la gestión del trastorno comprende proporcionar una dieta de protección del riñón como sustancialmente la dieta única para el felino.
19. El método de la cláusula 17 o la cláusula 18, en donde la dieta de protección renal comprende una o más de las siguientes modificaciones con relación a una dieta estándar del felino:
- 40 a. Reducción del fósforo
- b. Niveles reducidos de proteínas
- c. Reducción de sodio
- d. Niveles elevados de ácidos grasos omega-3

e. Niveles elevados de vitaminas del complejo B

f. Incremento de antioxidantes.

- 5 20. El método de una cualquiera de las cláusulas 17-19, en donde la dieta de protección renal comprende desde aproximadamente 18% a aproximadamente 40% de proteína, desde aproximadamente 0.2% a aproximadamente 0.85% de fósforo, y desde aproximadamente 0.04% a aproximadamente 0.35% de sodio, en una base de materia seca.
- 10 21. Un kit para uso en el método de cualquiera de las cláusulas anteriores para diagnosticar la existencia de un trastorno renal en un felino que comprende medios para la medición de la expresión de genes del uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en lumican; cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12; decorina; proteína 2 secretada relacionada con frizzled; proteína 5 de unión al retinol; MMP-2; MMP-7; y MMP-19 en una muestra biológica de un felino; e instrucciones para usar tales medios para medir la expresión de los uno o más biomarcadores en una muestra biológica del felino y para diagnosticar la existencia de un trastorno renal en el felino.
- 15 22. El kit de acuerdo con la cláusula 21, en donde el medio para la medición de los uno o más biomarcadores es una o más sondas de ácido nucleico capaces de detectar la expresión de genes del uno o más biomarcadores.
- 20 23. El kit de acuerdo con la cláusula 22, en donde la una o más sondas de ácido nucleico son capaces de hibridarse con una o más de SEQ ID NOS. 9-16.
- 25 24. El kit de acuerdo con la cláusula 23, en donde la una o más sondas de ácido nucleico comprenden una secuencia o secuencias seleccionadas de una o más de SEQ ID NOS. 1-8.
- 30 25. El kit de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 21-24 que comprenden una micromatriz de ADN que comprende una o más sondas de ácido nucleico capaces de detectar la expresión de genes del uno o más biomarcadores.
- 35 26. El kit de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 21-25 en donde el medio para la medición de los uno o más biomarcadores es uno o más anticuerpos o aptámeros capaces de detectar el uno o más biomarcadores.
27. El kit de acuerdo con la cláusula 26 en el formato ELISA que comprende uno o más anticuerpos capaces de detectar el uno o más biomarcadores, proteína aislada correspondiente al biomarcador para servir como un estándar, y solución reguladora.
28. El kit de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 19-27 en donde los uno o más biomarcadores incluyen proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) y/o proteína 5 de unión al retinol (rbp5).
29. Uso de una secuencia de nucleótidos correspondiente o complementaria a un gen para lumican de felino; cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12; decorina; proteína 2 secretada relacionada con frizzled; proteína 5 de unión al retinol; MMP-2; MMP-7; y MMP-19, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos correspondiente o complementaria a cualquiera de las SEQ ID NO 1-16, o de un anticuerpo para lumican de felino; cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12; decorina; proteína 2 secretada relacionada con frizzled; proteína 5 de unión al retinol; MMP-2; MMP-7; y MMP-19, en un método de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-20, o en la fabricación de un kit de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 21-28.

Tabla 3: Lista de biomarcadores

Gen	Símbolo felino	Sinónimos humanos	Sinónimos homólogos	Descripción del gen	ARNm	Proteína
Lumican	LUM	LDC; SLRR2D	Canino LUM	Similar a Lumican precursor	<i>XM_539716.2</i> <i>ID Gen: 482599</i>	<i>XP_539716.1</i>
Gen	Símbolo felino	Sinónimos humanos	Sinónimos homólogos	Descripción del gen	ARNm	Proteína

Gen	Símbolo felino	Sinónimos humanos	Sinónimos homólogos	Descripción del gen	ARNm	Proteína
Cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12	COL3A1	EDS4A; FLJ34534	Equino COL3A1	Colágeno de tipo III, alfa 1 (síndrome de Ehlers Danlos IV, dominante autosómico)	XM_001917620.1. ID Gen:100034123	XP_001917655
Decorina	DCN	CSCD; DSPG2; PG40; PGI; PGS2; SLRR1B	Canino DCN	Decorina	NM_001003228.1. ID Gen: 403904	NP_001003228.1
SFRP2	SFRP2	FRP-2; SARP1; SDF-5	Canino Sfrp2	Proteína 2 secretada relacionada con frizzled	NM_001002987.1 ID Gen: 475471	NP_001002987.1

Tabla 4: Lista de biomarcadores

Gen	Símbolo felino	Sinónimos humanos	Sinónimos homólogos	Descripción del gen	ARNm	Proteína
Proteína 5 de unión al retinol	Rbp5	Rbp-5	Canino Rbp5	Proteína 5 de unión al retinol, celular	XM_848184.1 LOC477706	XP_853277.1
MMP-2	MMP2	MMP2	Canino	Metaloproteinasa de matriz 2 (gelatinasa A, gelatinasa de 72kDa, colagenasa de tipo IV de 92kDa)	XM_535300.2 ID Gen: 4037333	XP_535300.2
MMP-7	MMP7	MMP7 PUMP-1	Felino PUMP-1	Metaloproteinasa de matriz 7	FDU04444 GeneBank U04444.1	AAA18222.1
MMP-19	MMP19	MMP19	Macaca Mulatta MMP19	Metaloproteinasa de matriz 19	XM_001111542.1	XP_001111542.1

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AL-MURRANI, SAMEER WALEED

GAO, XIANGMING

MALLADI, SUKHASWAMI

<120> Composiciones y métodos para el diagnóstico y tratamiento de trastornos renales en un felino

<130> 8888P-00-US
<140>
<141>
<160> 16
5 <170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda de síntesis
<400> 1
atcaccgcac gaggcttca aataa 25
<210> 2
15 <211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda de síntesis
20 <400> 2
agtgctgag ggtctgact accac 25
<210> 3
<211> 25
<212> ADN
25 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda de síntesis
<400> 3
attcaagcg ttcagtgagg ctgca 25
30 <210> 4
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda de síntesis

<400> 4

atacatccag gttgtctacc ttcac 25

5 <210> 5

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda de síntesis

<400> 5

atgccagtcc tgggaatgtt ccacg 25

<210> 6

<211> 25

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda de síntesis

<400> 6

20 agacctacat cttgctgga gacaa 25

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda de síntesis

<400> 7

atgcccggc gagagcttga aattc 25

<210> 8

30 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 590 263 T3

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda de síntesis

<400> 8

atgcagctct ctattgcct tcaa 25

<210> 9

5 <211> 534

<212> ADN

<213> Felis domesticus

<400> 9

aacccccacc	agatcatgta	gaaatgttta	aactaataaa	atcatgaata	tttttatgaa	60
gtttttaaat	agctcgcttt	agtgttgaat	agctacaacc	gtgacttggg	tctgatattt	120
ttgtttttct	gtttggtttg	ggtcagctgt	ttttcacttt	ctgctaaggt	tgccataacg	180
tgcaaatagc	ttcatttttc	aatgtggccc	aaactgttgt	gggtcacaaa	cctcgttgag	240
ataaagctgg	ctgttatctc	aacatgtctc	ggctccagcc	tgagactgag	agcctaagtc	300
ttcaaattca	cttgtacttt	cacccctca	ttgggaactt	acagcagtcg	catgttatta	360
cacttccacg	tagagtactt	ccatctctaa	agagcacatt	aaccatcacc	gcacgagttc	420
ttcaaataaa	gggccaacag	acagatttca	taactgaact	gogtacttta	agctttgttt	480
caaacacttt	tctatctaat	tctgcaaact	caaccattgt	agcttaccgg	ctaa	534

10 <210> 10

<211> 331

<212> ADN

<213> Felis domesticus

<400> 10

agtcagttcc	agatacagcg	tctctccctc	cagccagtgt	ctccagcctc	ggttggggac	60
ctcccctttc	tgacacacata	ctagctgctc	ctcctcccag	gttactatgg	tctggcattt	120
tcgtccatcc	acgatcctta	gatcttcttc	aaactcaact	cccacatcga	attccagaat	180
gtagttgggg	aaggtgctga	gggtcttgac	taccacgtgg	ttgccctgat	ggtcaatctc	240
cttgtctggc	ttgaccagca	gcgctatctt	ccgcaaggcc	atgcggaatg	tttagggctt	300
gcaagtaagg	gtttcatggt	cttctgccaa	a			331

15

<210> 11

<211> 411

<212> ADN

ES 2 590 263 T3

<213> Felis domesticus

<400> 11

tggatctcca gcttacgcac aacaagataa cgaagcttgg ctcccttcgat ggactggtaa	60
acctgacctt cgtccacctc caacacaatc aactgaaaga ggatgctggt tcagctgctt	120
ttaaaggtct taagtccctc gaataccttg acttgagctt caaccagatg gccaaactgc	180
cctctgggtct cccagcatct cttctaactc tctacttggc caacaataag atcagcaaca	240
tccttgatga gtatttcaag cgtttcagtg ggctgcagta tctacgttta tctcacaatg	300
aactggctga tagtggagta cctggaaatt cttttaatgt atcatccctg cttgagctgg	360
atctctccta taataagctt aaaaacatac cgactgtcaa cgagaacctt g	411

<210> 12

5 <211> 458

<212> ADN

<213> Felis domesticus

<400> 12

atgaagaagc tgtcctacat ccgcattgcc gacaccaata taaccaccat cccgcaaggt	60
cttcctcctt cccttactga attacatctt gaaggcaaca aaatctocaa agttgatgca	120
gctagcctga aaggactgaa taatttggct aagttgggac tgagttttaa cagcatctct	180
gctattgaca atggcactct ggccaacact cctcatttga gggagcttca cttggacaac	240
aataagctta tcagagtacc tgggtgggctg gcgagcaca aatacatcca ggttgtctac	300
cttcataaca acaatatctc tgcagtcggg tctaacgact tctgcccact gggatacaac	360
acaaaaaagg gctttottaat caggtgtgaa cccttttcag caaoccatcc catactggga	420
gaatccaccc tccaccttcc atgggtctat ttgcgttc	458

10 <210> 13

<211> 535

<212> ADN

<213> Felis domesticus

<400> 13

ES 2 590 263 T3

agacctgaag ttctgccatc ctgaactcca gagtggagaa tattggattg atcctaacca 60
 aggctgcaag ttggatgcta ttaaagtatt ctgtaatatg gaaactgggg aaacatgoat 120
 aatgccagt cctgtgaatg ttccacgtaa gaactggtgg atagattotg gtgctgagaa 180
 gaaacatggt tggtttgag aaaccatgga tgggtggttt cagtttagct atggcaatcc 240
 tgaccttct gaagatgtcc tcgatgtcca gctggcattc ctccgacttc tctccagccg 300
 ggcctccaa aacatcacgt atcactgcaa gaatagcatt gcatacatgg atcaggccag 360
 tgggaatgta aagaaagccc tgaggctgat gggttcaatg aaggatgaatt ccaggctgaa 420
 gggaatagca aattcacata cacagttctg gaggatggtt gcactaaaca cactggggga 480
 atggggcaaa acagtcttca aatatcgaac acgcaaggcc gtgagattac ctatt 535

<210> 14

<211> 511

<212> ADN

5 <213> Felis domesticus

<400> 14

gaatactggg tctactcagc cagcaacctg gagcgagggt accccaagcc gotgaccage 60
 ctggggctgc cccccgacgt ccagcgggta gatgctgctg ttaactggag caagaacagg 120
 aagacctaca tctttgctgg agacaagttc tggaggtaca atgaagtaa gaaaaagatg 180
 gacctggct tccccagct catcgoggat gcoctggaacg ccatccccga taacctggac 240
 gccgtggtcg acctgcaggg cgggtggtcac agctacttct tcaagggcgc gtattacctg 300
 aagttggaga accagagtct gaagagcgtg aaatttgaa gcatcaaate cgactggctg 360
 ggcctgctgag cgcctctgg ctctctcagg ccccgcgct ccattgtctc tgcaaaaacca 420
 ggcctgagc gccaggaag gaccoggaag ggcctggca gcctttcagc tctgtagtta 480
 atcagcgttc tcacctacc tggtaattha a 511

<210> 15

<211> 527

10 <212> ADN

<213> Felis domesticus

<400> 15

ES 2 590 263 T3

tgaatgaacg tgtgctctcc ccgaagttcc tacttctttc ttgatttact tctctttcca 60
 tacaattcot ggattttctct gatatogccc ggcgagagct tgaaattctc agagtcctctg 120
 gctccgtagg tggggtacat gacagagtcg ggatcagacg aatgtctcag gccagagaa 180
 tggccaagtt catgggttgc aacagccagg aagttaattc ctagaccctt gccgtcggcc 240
 cagcgtcgt cctcatcgaa gtgggcgtct cctcccaggc ccggcccagc ttcgtaggca 300
 tgggccagtg tgcctcctgg tccgtcaaat gggtagaagt ccccgtagc tcctcttgca 360
 aagccaatca cgatatcggg aattcccagc acaactctcc tgaaggatag tgggatctct 420
 ttgctccaca tattcaagc ctttgccact aatgatcca ctgtgacacg tggtaagtct 480
 cgagtgtatg atatgatcct gtaggtgacc actttggaaa tcccctt 527

<210> 16

<211> 511

<212> ADN

5 <213> Felis domesticus

<400> 16

gaaacctaga tgctgctgtc tactctcttc gaacacaatg gattcacttc ttttaaggag 60
 acaagggtgtg ggcctatatt aatttcaaga tgtctcctgg ctttcccaag aagctgaata 120
 gggtagaacc ccacctggat gcagctctct attggccttt caataaaaag gtgttctctt 180
 ttaagggctc cgggtactgg cagtgggacg agctggcccg aactgacttc agccactacc 240
 ctaaaccaat caagggattg tttacaggag tgccagacca gccctctgct gctatgggtt 300
 ggcgggatgg ccatgtctac ttcttcaagg gtaaacagta ctggcgcttc aaccagcagc 360
 ttogagtaga gaaaggctat ccagagata ctgccacaaa ttggatgcac tgtcatcccc 420
 agacctcaaa caatactcca ttgggtgggg acaccactcc ttcagggact gacaactcaa 480
 ccataggaac aaactttgga tacccttctt c 511

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de diagnóstico de la existencia de un trastorno renal en un felino que comprende medir el nivel de expresión de proteína 2 secretada relacionada con frizzled en una muestra biológica del felino, en donde las diferencias en expresión de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled en la muestra con relación a un valor de control para la expresión en una muestra de un animal normal indican la existencia de un trastorno renal.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la detección de niveles de expresión de unión a retinol proteína 5 (rbp5) y, opcionalmente, niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: lumican (LUM); decorina (DCN); cadena del colágeno alfa 1 (III), variante 12 (COL3A1)); metaloproteínasa de la matriz-2 (MMP2); metaloproteínasa de la matriz-7 (MMP7, PUMP-1); y metaloproteínasa de la matriz-19 (MMP19).
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el nivel de expresión de proteína 2 secretada relacionada con frizzled se determina midiendo la expresión de genes de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled utilizando ya sea (i) una micromatriz de ADN que comprende uno o más oligonucleótidos complementarios a ARNm o ADNc correspondientes a la proteína 2 secretada relacionada con frizzled, o (ii) una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con cebadores de oligonucleótidos para ARNm o ADNc correspondientes a la proteína 2 secretada relacionada con frizzled que se va a medir.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en donde la etapa de medición de la expresión de genes de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled comprende (i) aislar el ARN de la muestra de tejido, (ii) transcripción inversa del ARN para obtener el ADNc correspondiente, (iii) aislar y fragmentar el ADNc obtenido de este modo, (iv) poner en contacto los fragmentos de ADNc con una micromatriz de ADN que comprende uno o más oligonucleótidos complementarios a ADNc correspondientes a proteína 2 secretada relacionada con frizzled, y (v) detectar la hibridación entre los fragmentos de ADNc y los uno o más oligonucleótidos en la micromatriz de ADN, preferiblemente en donde los oligonucleótidos en la micromatriz de ADN comprenden una o más sondas capaces de hibridarse con la SEQ ID NO. 9, y más preferiblemente, en donde los oligonucleótidos en la micromatriz de ADN comprenden una o más sondas que comprenden SEQ ID NO. 1.
- 25 5. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el nivel de expresión de proteína 2 secretada relacionada con frizzled se detecta mediante un anticuerpo a la proteína expresada, y, opcionalmente, en donde la proteína 2 secretada relacionada con frizzled se detecta mediante un inmunoensayo seleccionado entre un ensayo de unión competitiva, un ensayo de unión no competitiva, un radioinmunoensayo, un ensayo inmunoabsorbente con enzima ligada (ELISA), un ensayo de tipo sándwich, una reacción de precipitina, un ensayo de inmunodifusión de difusión en gel, un ensayo de aglutinación, un inmunoensayo fluorescente, inmunoensayo de quimioluminiscencia, inmunoensayo immunoPCR, un inmunoensayo de proteína A o proteína G y un ensayo de inmunoelectroforesis.
- 30 6. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el nivel de expresión de proteína 2 secretada relacionada con frizzled se detecta mediante la medición de la cantidad de proteína en la muestra utilizando espectroscopia de masas cuantitativa, o en donde el nivel de expresión de proteína 2 secretada relacionada con frizzled se detecta por un aptámero que reconoce la proteína expresada.
- 35 7. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la muestra biológica es sangre o una muestra de tejido renal, y opcionalmente, en donde el método comprende la detección de niveles de expresión de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled (SFRP2) y proteína 5 de unión al retinol (rbp5).
- 40 8. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde el felino tiene la función renal esencialmente normal, como se mide mediante uno o más de los siguientes: medición de filtración glomerular normal, medición de depuración de creatinina, niveles de proteína en orina, niveles de creatinina en suero, niveles de creatinina urinaria, niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN), marcación metabólica con radioisótopo, obtención de imágenes de tejidos blandos, incluyendo ecografía, exploración de resonancia magnética y/o tomografía computarizada, y opcionalmente, en donde el trastorno renal es un trastorno caracterizado por una pérdida anormal de la función renal, insuficiencia renal, medición de la filtración glomerular reducida o glomerulonefritis, preferiblemente, en donde el trastorno renal es glomerulonefritis.
- 45 9. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde la existencia de un trastorno renal está indicada por una diferencia significativa en la expresión de proteína 2 secretada relacionada con frizzled en relación con los valores de expresión control en donde una "diferencia significativa" es un aumento de al menos dos veces.
- 50 10. Uso de un kit en el método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para el diagnóstico de la existencia de un trastorno renal en un felino, en donde el kit comprende medios para medir la expresión de genes de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled en una muestra biológica de un felino; e instrucciones para usar tales medios para medir la expresión de los uno o más biomarcadores en una muestra biológica del felino y para diagnosticar la existencia de un trastorno renal en el felino.

11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde los medios para medir la proteína 2 secretada relacionada con frizzled es una o más sondas de ácido nucleico capaces de detectar la expresión de genes de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled,
- 5 preferiblemente en donde la una o más sondas de ácido nucleico son capaces de hibridarse con la SEQ ID NO: 9, y más preferiblemente en donde las una o más sondas de ácido nucleico comprenden SEQ ID NO. 1.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde el kit comprende una micromatriz de ADN que comprende una o más sondas de ácido nucleico capaces de detectar la expresión de genes de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled.
- 10 13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde los medios para medir la proteína 2 secretada relacionada con frizzled es uno o más anticuerpos o aptámeros capaces de detectar la proteína 2 secretada relacionada con frizzled.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el formato ELISA que comprende uno o más anticuerpos capaces de detectar la proteína 2 secretada relacionada con frizzled, proteína aislada correspondiente a la proteína 2 secretada relacionada con frizzled para servir como un estándar, y solución reguladora.
- 15 15. Uso de una secuencia de nucleótidos correspondiente o complementaria a un gen de la proteína 2 secretada relacionada con frizzled de felino; opcionalmente en donde la secuencia de nucleótidos corresponde a o es complementaria a SEQ ID NO: 1; o de un anticuerpo para la proteína 2 secretada relacionada con frizzled de felino; en un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 7 a 9.

Figura 1a

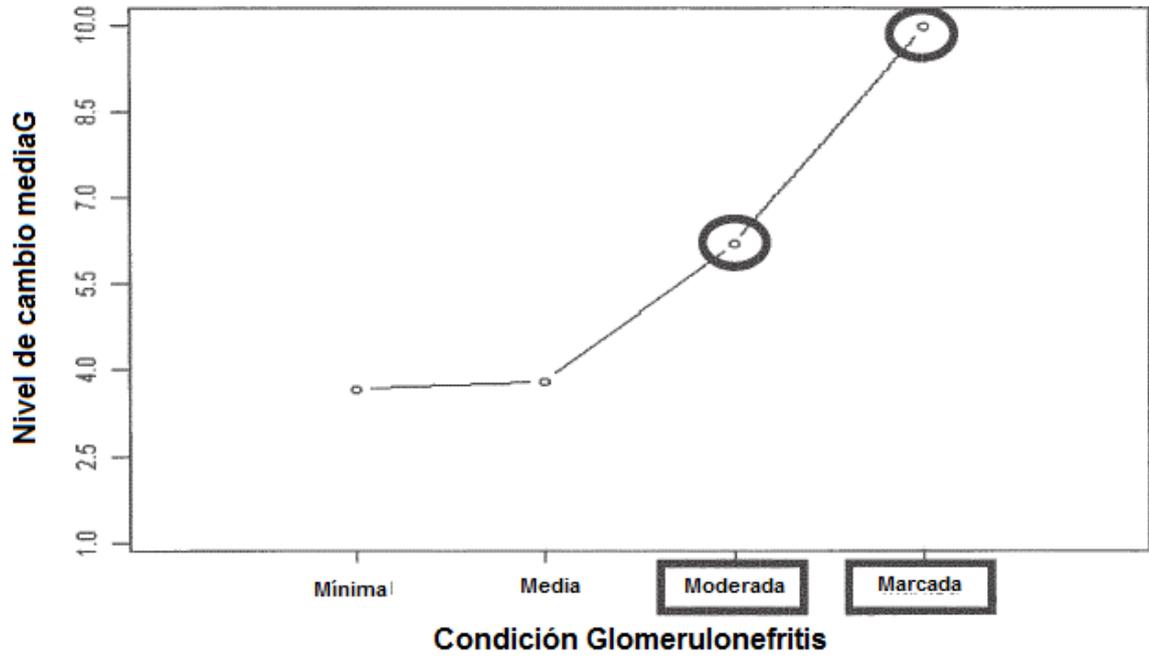


Figura 1b

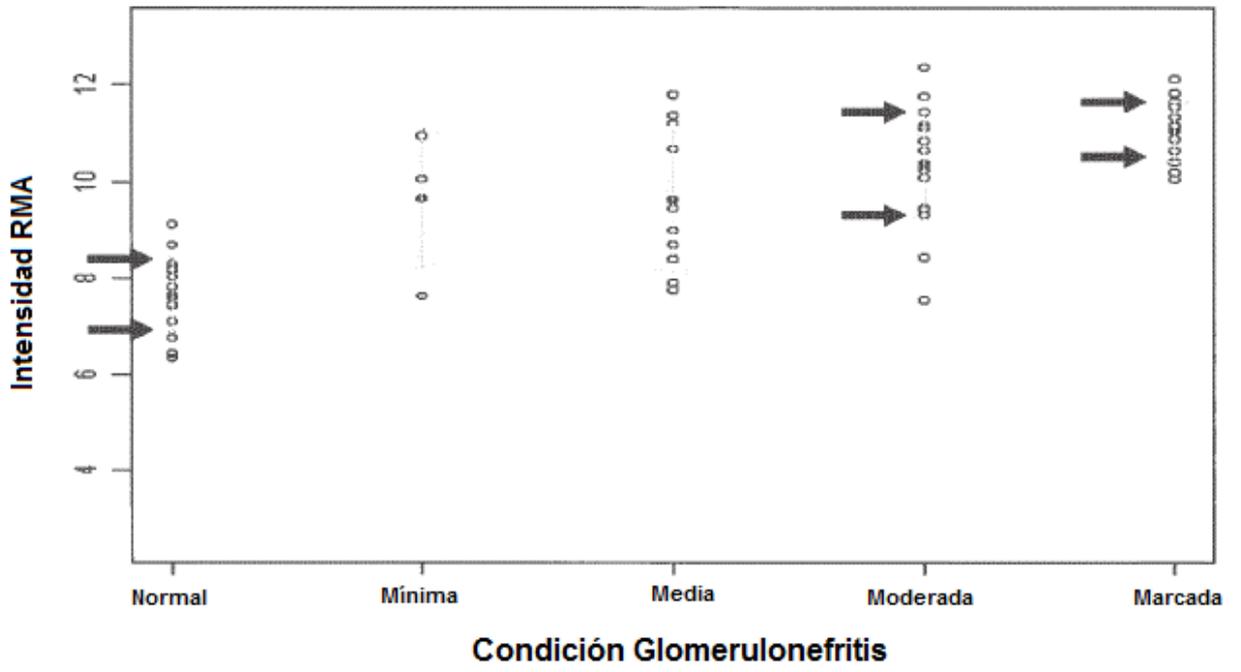


Figura 2a

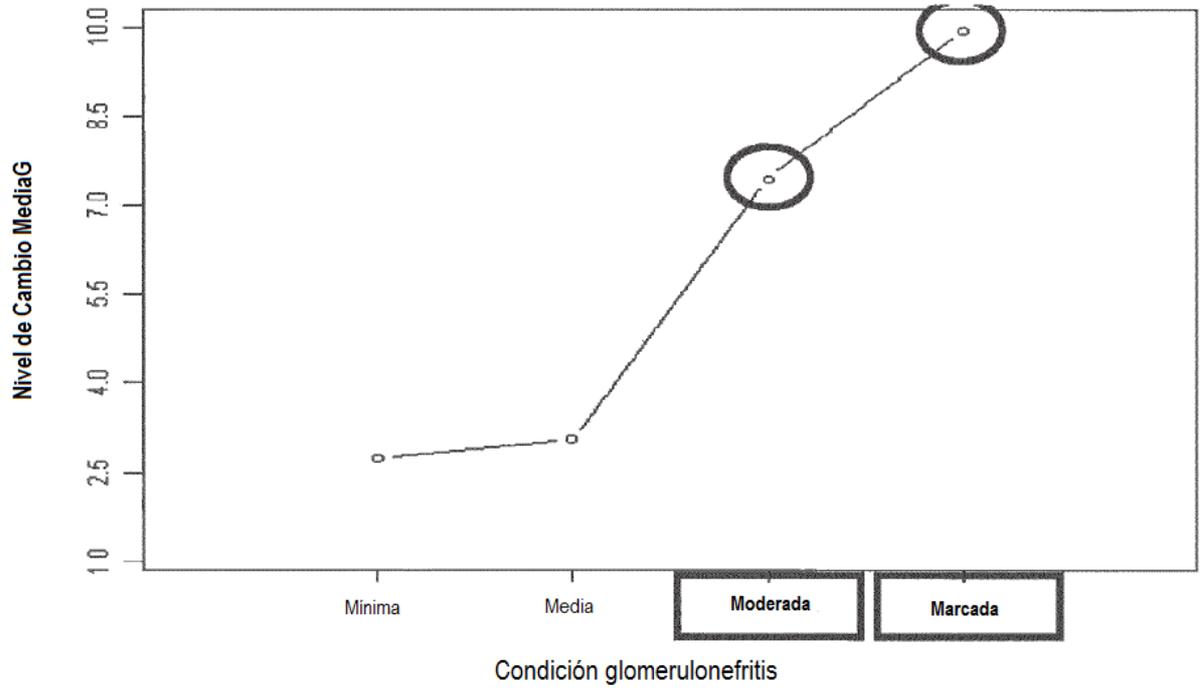


Figura 2b

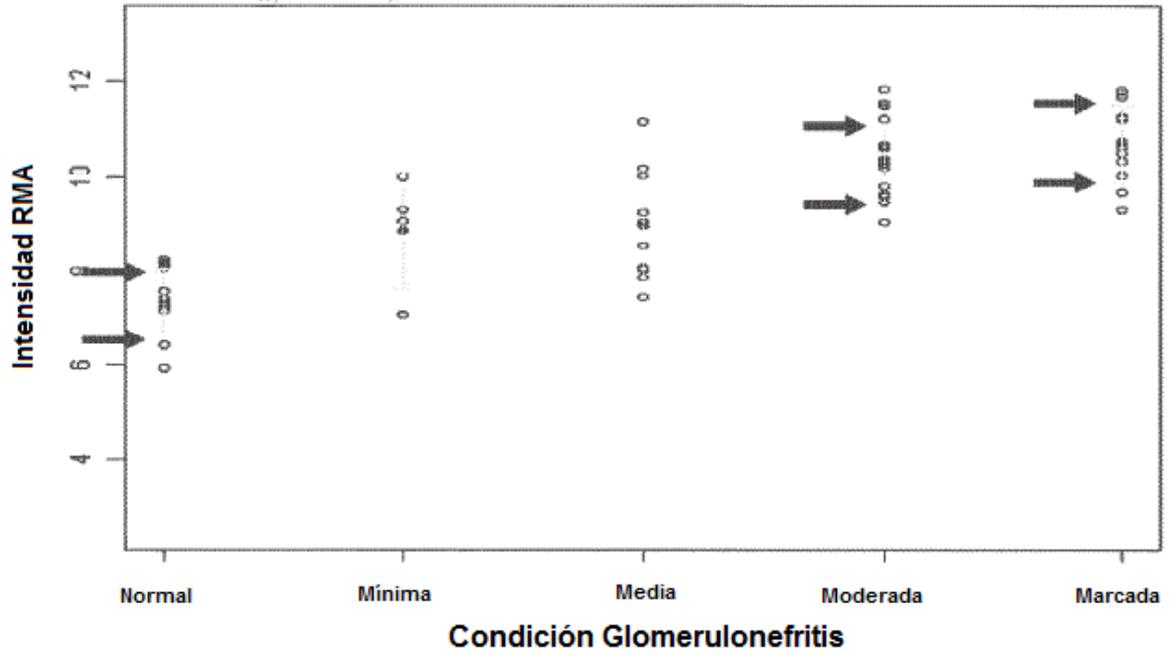


Figura 3a

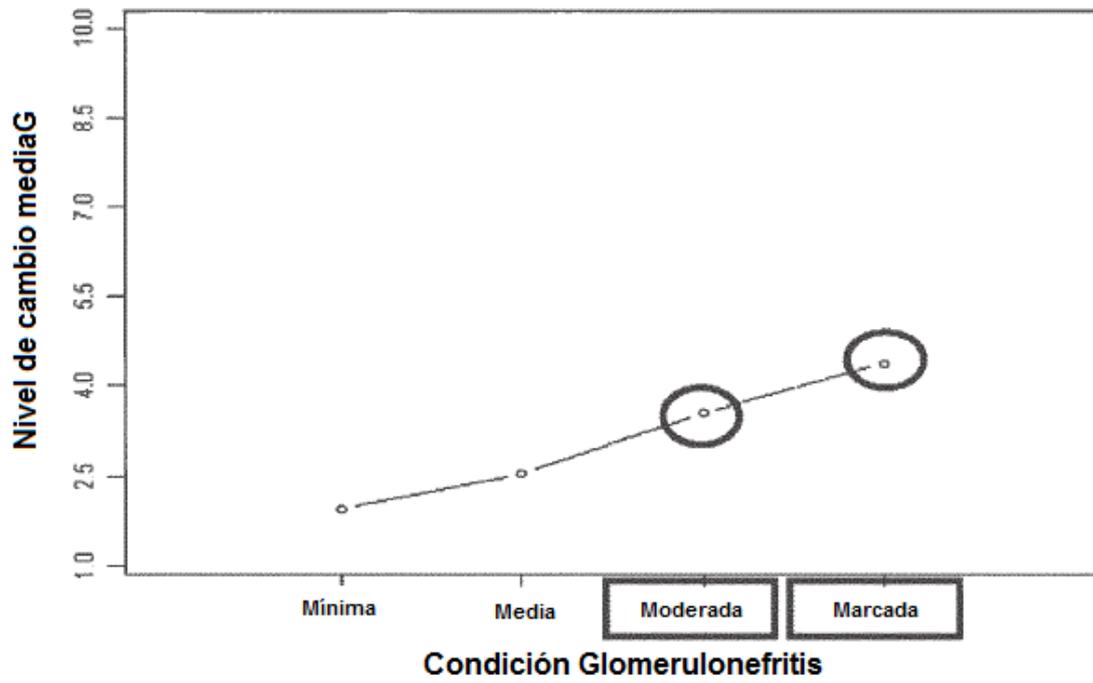


Figura 3b

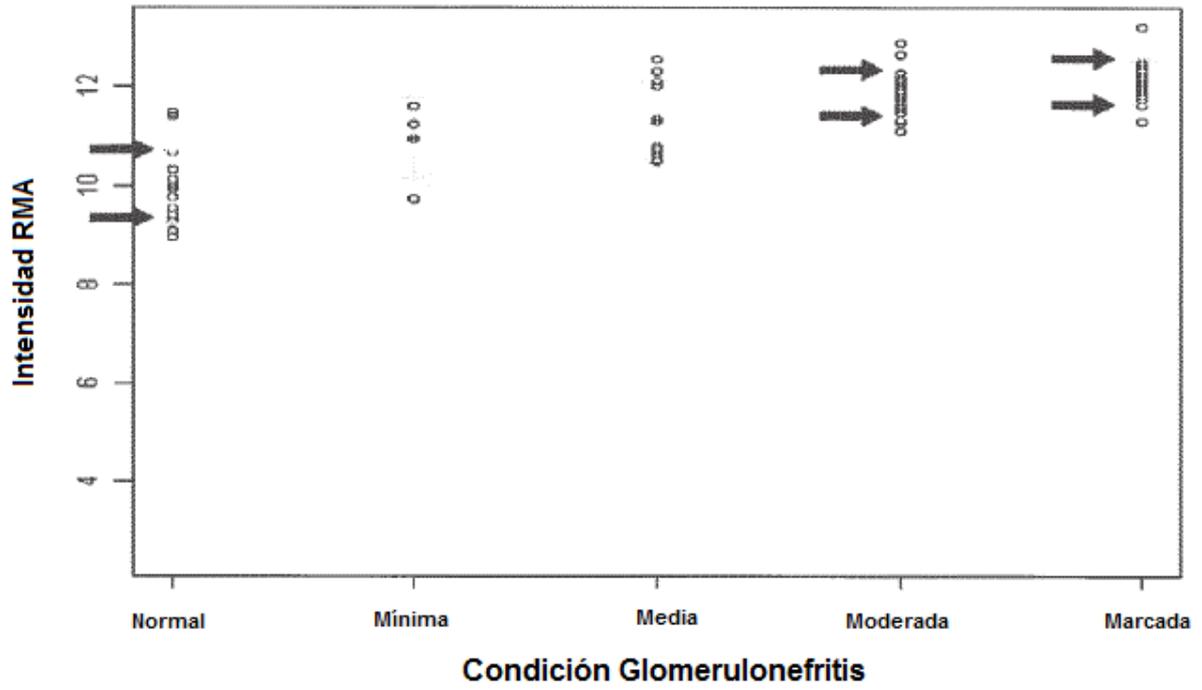


Figura 4a

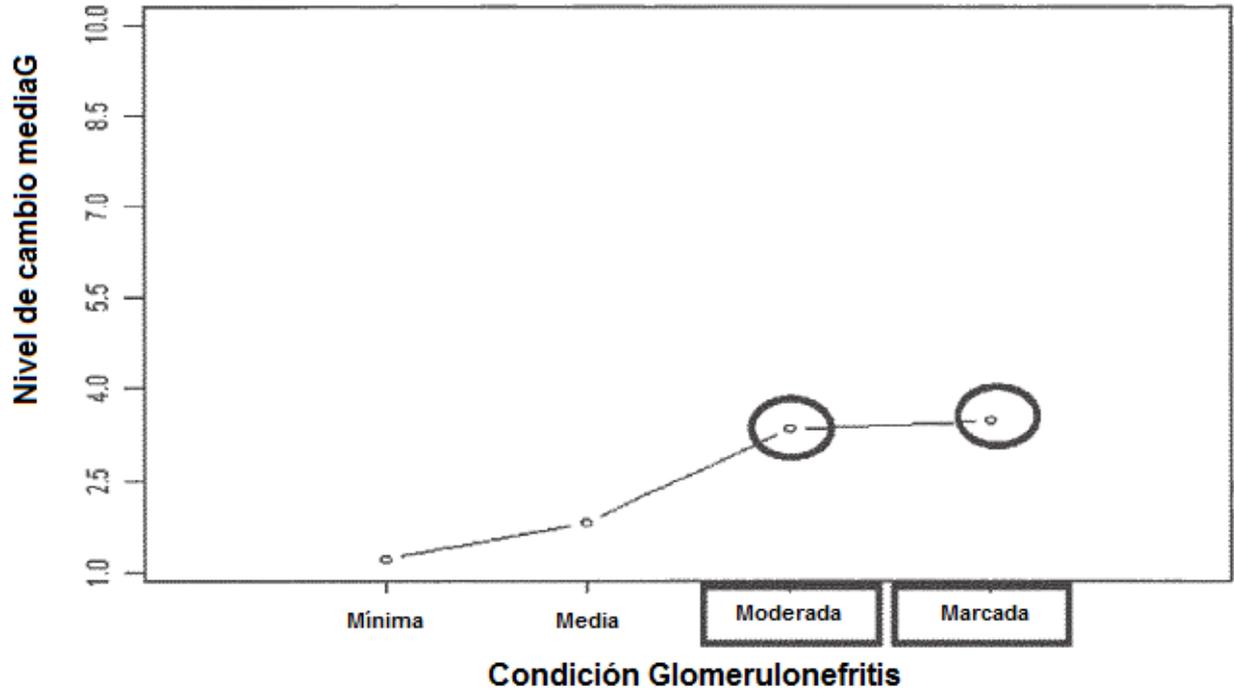


Figura 5a

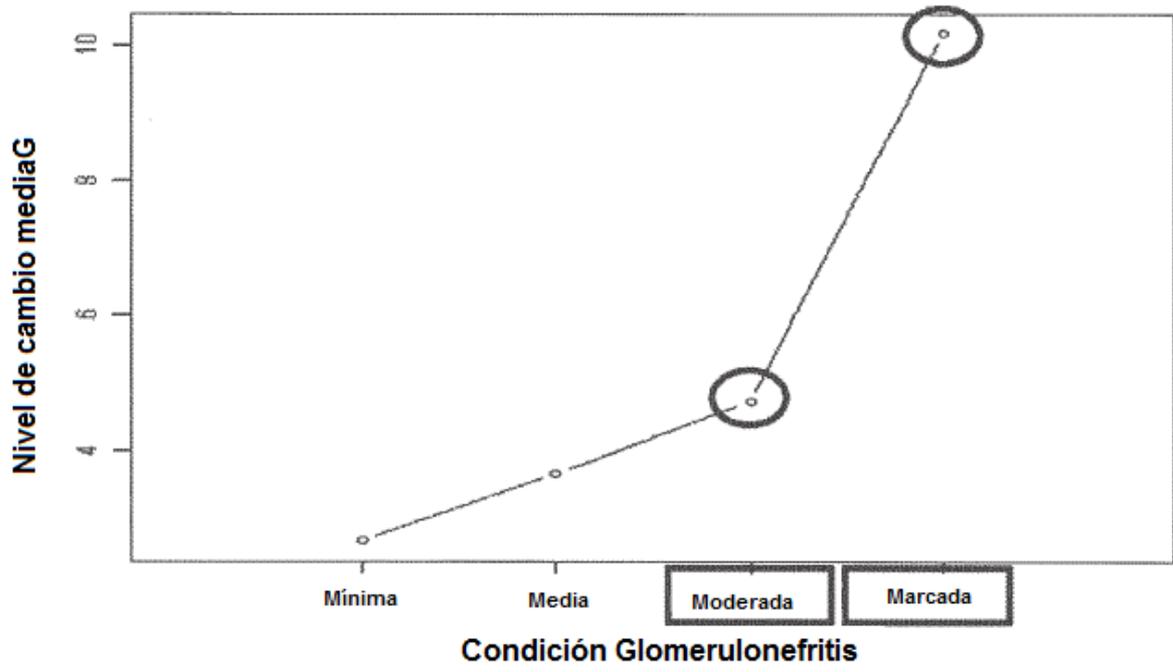


Figura 5b

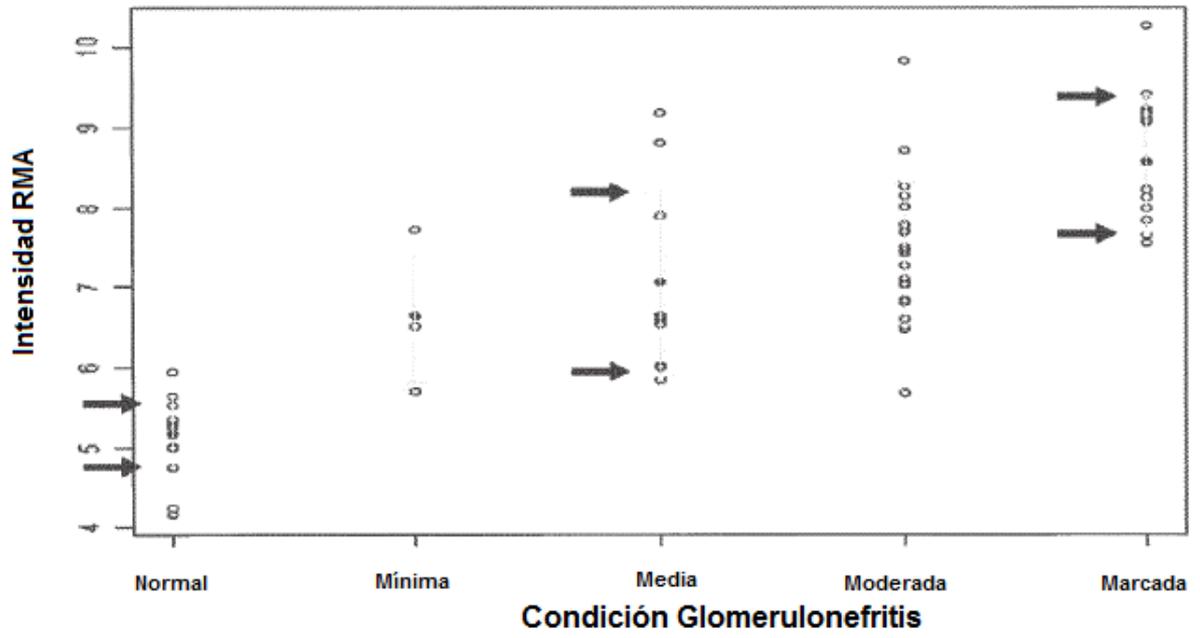


Figura 6a

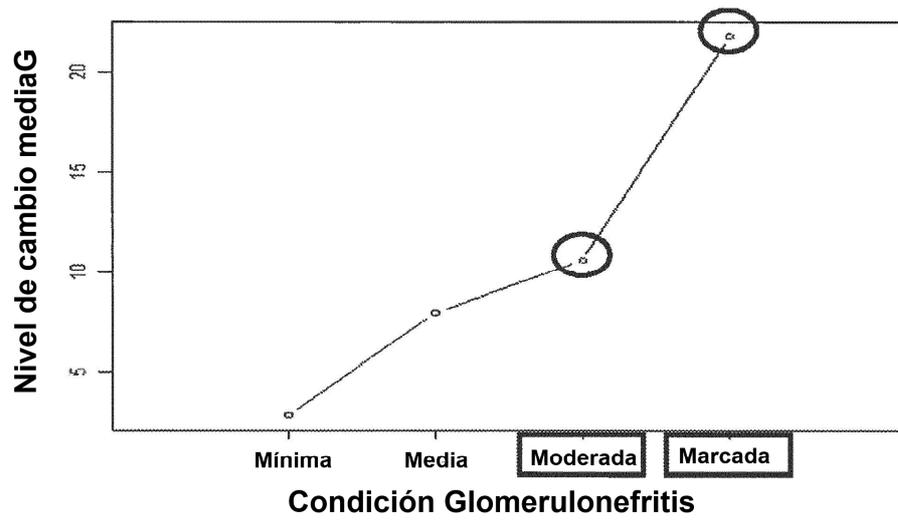


Figura 7a

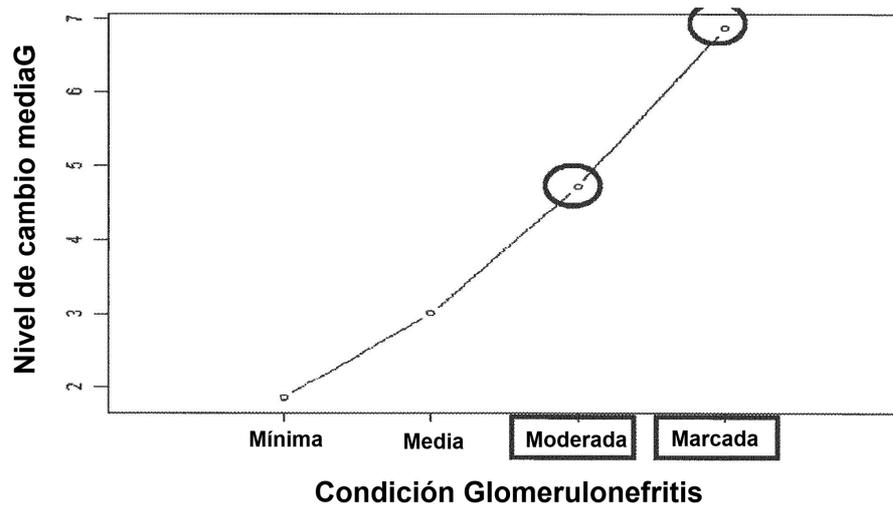


Figura 7b

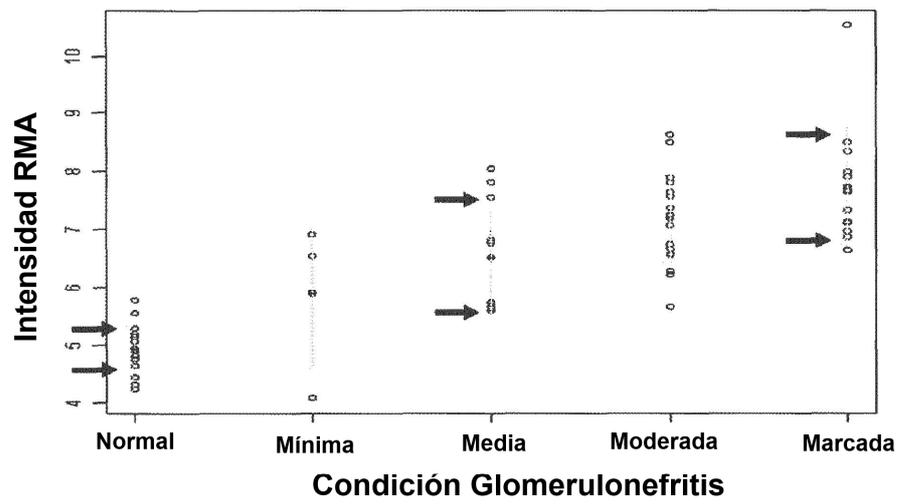


Figura 8a

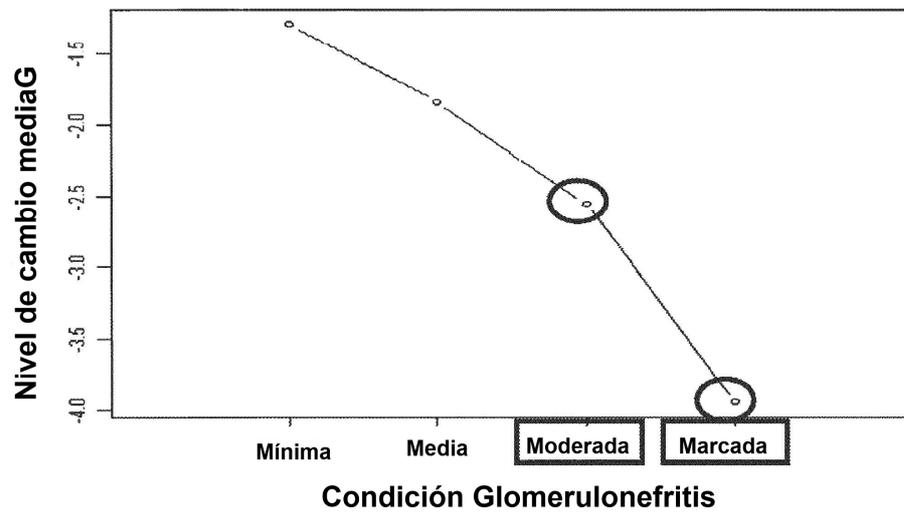


Figura 8b

