

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 520**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2006** **E 12150519 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016** **EP 2469284**

54 Título: **Diagnóstico y control de enfermedad renal crónica utilizando NGAL**

30 Prioridad:

13.10.2005 US 374285

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

19.06.2017

73 Titular/es:

**CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER
(50.0%)
3333 Burnet Avenue
Cincinnati, OH 45229-3039, US y
THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**BARASCH, JONATHAN, M.;
DEVARAJAN, PRASAD;
NICKOLAS, THOMAS, L. y
MORI, KIYOSHI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 617 520 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

Diagnóstico y control de enfermedad renal crónica utilizando NGAL

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de NGAL para controlar y evaluar enfermedad renal crónica.

Antecedentes de la invención

10 Durante los últimos veinte años, se ha aprendido que una identificación y un tratamiento tempranos del riñón pueden prevenir el avance de la enfermedad del mismo. Por tanto, un biomarcador de la lesión renal que indique la presencia temprana de una lesión y que se pueda utilizar para identificar a los pacientes con un mayor riesgo de la enfermedad progresiva, repercutiría favorablemente en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad renal. La creatinina en suero, el marcador actual de la función renal, depende de la masa muscular, del género, de la raza y de las medicaciones. Asimismo, para diagnosticar una insuficiencia renal progresiva es necesario realizar medidas de la creatinina de forma repetitiva. Estas limitaciones suelen tener como resultado el diagnóstico de la enfermedad renal únicamente cuando se ha producido ya una lesión significativa. Un mayor grado de lesión en el momento del diagnóstico limita la eficacia de las terapias de conservación de la función renal y supone mayores tasas de avance de la enfermedad. El arsenal de los autores de la invención contra la enfermedad renal se basa en la intervención temprana e incluye la interrupción del sistema renina-angiotensina y en un control agresivo de la tensión arterial, la diabetes y los lípidos.

25 Un marcador temprano de la lesión renal impulsaría una intervención más temprana para detener el avance hacia la insuficiencia renal en fase terminal (IRT), la afección en la que los riñones dejan de trabajar permanentemente. Para que sea útil para el profesional clínico general, el biomarcador indica preferentemente la lesión renal de forma más temprana y antes que los indicadores de la función renal actuales, está disponible de forma no invasiva y se puede interpretar fácilmente sin el uso de complejas correcciones y solamente requiere una sola medida.

30 La repercusión de un marcador temprano de la enfermedad renal en la práctica se puede demostrar mejor haciendo una revisión de los cambios demográficos de la enfermedad renal. Según los datos epidemiológicos de las enfermedades renales crónicas (ERC), en la próxima década, se duplicará la incidencia de insuficiencia renal en fase terminal, repercutiendo directamente en los gastos en sanidad. Sin embargo, esto representa solamente la punta del iceberg, ya que se estima que el número de pacientes en las primeras fases de la enfermedad renal crónica excederá en 50 veces más al de los que alcanzan la insuficiencia renal terminal. La identificación temprana de la enfermedad renal crónica y la detección a tiempo del avance constituyen verdaderos desafíos globales a los que se enfrenta la comunidad de los especialistas en nefrología, sobre todo, teniendo en cuenta que se dispone de varias intervenciones primarias y secundarias prometedoras para desacelerar el avance. Para controlar los costes, los médicos necesitarán disminuir las tasas de avance de enfermedad renal crónica que desemboca en insuficiencia renal terminal. Incluso un pequeño descenso de la tasa de avance puede suponer una gran ganancia económica si se evita que los pacientes requieran terapia de reemplazo renal (TRR).

45 Los marcadores actuales de la enfermedad renal y el avance de la enfermedad renal son la creatinina en suero y la concentración de proteína urinaria, incluyendo la microalbúmina. Se ha demostrado que la pendiente del descenso de la tasa de filtración glomerular (TFG) predice el momento de la IRCT, y en múltiples estudios se ha demostrado que el nivel de proteinuria está relacionado con tasas de avance de la enfermedad renal. Se trata de biomarcadores de enfermedad renal útiles y su avance se ha sometido a examen en múltiples estudios. No obstante, su capacidad para reconocer enfermedad renal temprana está limitada. Se reconoce que la concentración de creatinina en suero constituye una medida poco fiable de la función renal, ya que depende de la edad, el género, la raza, la masa muscular, el peso, el grado de ejercicio físico del sujeto y diversas medicaciones. La correcta interpretación de la función renal en función de la creatinina en suero requiere fórmulas completas que los asistentes médicos encargados no emplean de forma rutinaria. Por otra parte, para entender si la enfermedad es progresiva se necesitan medidas de creatinina en serie. Si bien la proteína urinaria es muy sensible a la enfermedad renal progresiva, su aparición tiene lugar cuando se ha producido ya una significativa lesión renal. Para que fuera útil al máximo, un biomarcador de la lesión renal temprana y/o progresiva debería aparecer como positivo lo más tempranamente posible cuando empieza a producirse una lesión renal.

60 Por tanto, existe una búsqueda activa de biomarcadores renales que puedan predecir el riesgo de enfermedad renal crónica progresiva de un paciente, con la esperanza de que la identificación temprana de enfermedad renal conduzca al tratamiento temprano o de que el biomarcador identifique una entidad tratable que pueda hacer descender las tasas de avance de la enfermedad renal. Algunos ejemplos de biomarcadores renales prometedores incluyen dimetilarginina asimétrica (ADMA), proteína de unión a ácido graso de tipo hepático (L-FABP), cistatina C, proteína C reactiva (PCR) y receptor soluble II de factor de necrosis de tumor (sTNF α). No está claro todavía el impacto que puedan tener estos biomarcadores en el tratamiento de la enfermedad renal crónica, en qué medida son eficaces para detectar el grado de lesión renal y si son incluso viables para un uso clínico generalizado. Tampoco está clara cuál es la correlación, si es que existe, de la aparición de estos marcadores con los marcadores

creatinina en suero y proteinuria. De hecho, se desconoce que estos biomarcadores proporcionen una medida directa de la lesión renal.

5 La cistatina C y L-FABP son producidas por las células fuera del riñón y dependen de la filtración a través de los glomérulos. ADMA es un inhibidor de óxido nítrico sintasa endógeno (ONS). Se ha demostrado que los niveles elevados predicen las tasas de avance de la enfermedad renal. PRC y sTNF α son medidas de la actividad inflamatoria. Se ha demostrado que existe una correlación entre sus niveles y el avance de enfermedad renal en estados inflamados. Parece haber una correlación entre PCR y la lesión endotelial, al tiempo que sTNF α ha sido asociado con lesión glomerular. Entre estos biomarcadores, tan solo ADMA, PCR y sTNF α podrían representar guías para terapia. Sin embargo, no existen datos bibliográficos acerca de su capacidad para detectar enfermedad renal preclínica.

15 Otros posibles biomarcadores incluyen sondas de matriz extracelular renal. Los estudios anteriores han demostrado que el grado de las alteraciones tubulointersticiales (TI) en la biopsia renal está muy relacionado con la función y el pronóstico renal. Dichas alteraciones son el resultado del depósito de moléculas de matriz extracelular (MEC) como respuesta a una lesión renal. Recientemente, se ha revisado el uso de sondas MEC y sondas relacionadas con MEC (RMEC) para evaluar resultados renales. Aunque las sondas MEC y RMEC se presentan como prometedoras en cuanto a su capacidad para predecir el desarrollo de microalbuminuria y el avance de enfermedad renal, no se emplean con comodidad ya que dichas pruebas requieren una biopsia de riñón.

20 Los resultados adversos de una enfermedad de riñón se basan en el nivel de la función renal y el riesgo de la pérdida de su función en el futuro. La enfermedad renal crónica tiende a empeorar con el tiempo. Por consiguiente, el riesgo de resultados adversos aumenta con el tiempo al agravarse la enfermedad. Muchas disciplinas dentro de la medicina, incluyendo las especialidades relacionadas con la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y los trasplantes han adoptado sistemas de clasificación en función de la gravedad para guiar las intervenciones clínicas, la investigación y la educación pública y profesional. Dicho modelo es esencial para cualquier enfoque de la salud pública para esta enfermedad.

30 La capacidad para frenar y detener el avance de la enfermedad renal crónica ha supuesto un cambio paradigmático en nefrología. Múltiples estudios han demostrado que un estricto control glicémico y de la presión arterial, así como el uso de agentes que bloquean el sistema renina-angiotensina, pueden disminuir la tasa de deterioro de la función renal. Un tratamiento más temprano y más agresivo de la diabetes, la hipertensión y la proteinuria ha sido el método más eficaz para prevenir el desarrollo y el avance de enfermedad renal crónica. Si bien el reconocimiento y modificación de estos factores de riesgo ha sido inestimable, estudios clínicos extensos han señalado que la incidencia y avance de enfermedad renal crónica está aumentando peligrosamente y que puede variar sustancialmente entre la población en riesgo de enfermedad renal. Por consiguiente, una mayor mejora en la prevención y en las recomendaciones de tratamiento debe promover la identificación temprana de pacientes con un mayor riesgo del avance de la enfermedad.

40 Las recientes directrices de la National Kidney Foundation (NKF) y del National Institute of Diabetes and Digestive Diseases (NIDDK) han instado a la identificación de nuevos marcadores de lesión renal. La identificación de nuevos marcadores de estratificación del riesgo puede derivar tanto de los ensayos biomédicos como de la genética humana. Por lo tanto, claramente siguen necesitándose métodos y biomarcadores adicionales para la detección temprana de la enfermedad renal crónica.

45 **Sumario de la invención**

50 La presente invención proporciona, entre otras cosas, métodos para evaluar el estado renal presente o progresivo en un sujeto mamífero que padece una enfermedad renal crónica (ERC) y/o insuficiencia renal crónica (IRC), o que está en riesgo de desarrollarla, y que presenta un empeoramiento de ERC e IRC, a través de la detección de la cantidad (p.ej. determinando el nivel) de lipocaina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) en una muestra de suero o plasma. La invención proporciona también un método para controlar la eficacia de un tratamiento para lesión renal crónica determinando el nivel de NGAL en la muestra de suero o plasma antes y, en particular, después del tratamiento. Las propiedades y características de NGAL como biomarcador permiten su uso de esta manera para la detección temprana de lesión renal crónica o los cambios en el estado de lesión renal crónica.

60 Un aspecto de la invención proporciona un método para la detección temprana de lesión renal crónica en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de: i) proporcionar una muestra de suero o plasma de un mamífero que no presenta lesión renal aguda, infección vírica o bacteriana aguda, inflamación aguda, lesión aguda o crónica de otro órgano distinto al riñón ni un cáncer, que aporte al nivel de NGAL en la muestra, ii) detectar (p.ej. determinar) el nivel de NGAL en la muestra (p.ej. empleando un anticuerpo contra NGAL); y iii) evaluar el estado de la lesión renal crónica del sujeto en función del nivel de NGAL en la muestra, siendo el nivel de NGAL en una muestra de un mamífero con lesión renal crónica elevado en comparación con el nivel de NGAL en una muestra de un mamífero con la función renal normal. La evaluación del estado de lesión renal crónica se puede utilizar para determinar si la lesión renal crónica es sub-clínica, estable o avanzada (enfermedad renal progresiva). El método sirve asimismo para evaluar si el estado renal evoluciona hacia una lesión renal progresiva o un

empeoramiento de la lesión renal únicamente con una sola muestra y un solo ensayo.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para la detección de cualquier cambio en el estado de la lesión renal crónica en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende las etapas i) y ii) antes descritas; iii) proporcionar al menos una muestra posterior del suero o plasma del mamífero transcurrido un período de tiempo después de obtener la primera muestra; iv) detectar (p.ej. determinar) el nivel de NGAL en la al menos una muestra posterior de suero o plasma (p.ej. utilizando un anticuerpo contra NGAL); y v) evaluar el estado de lesión renal crónica del mamífero en función de la comparación del nivel de NGAL en al menos una muestra posterior de suero o plasma con el nivel de NGAL en la primera muestra. Por lo general, un nivel más alto de NGAL en la muestra posterior es indicativo de un deterioro o empeoramiento del estado de la lesión renal crónica en un sujeto (p.ej. y posiblemente del empeoramiento de una lesión renal crónica) y un menor nivel de NGAL en la muestra posterior es indicativo de la mejora del estado de lesión renal crónica del sujeto (p.ej. y posiblemente de una mejora de la lesión renal crónica).

Otro aspecto de la invención proporciona un método para controlar la eficacia de un tratamiento para la lesión renal crónica en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende las etapas de: i) proporcionar una muestra basal de un fluido corporal de un mamífero que presenta una lesión renal crónica, seleccionándose el fluido corporal del grupo que consiste en plasma y suero; ii) detectar (p.ej. determinar) el nivel de NGAL en la muestra basal (p.ej. empleando un anticuerpo contra NGAL); iii) administrar al mamífero al menos un tratamiento para la lesión renal crónica; proporcionar al menos una muestra post-tratamiento del fluido corporal del mamífero; v) detectar (p.ej. determinar) el nivel de NGAL en la muestra post-tratamiento (p.ej. empleando un anticuerpo contra NGAL); y vi) evaluar la eficacia del tratamiento en función de la comparación del nivel de NGAL en la muestra post-tratamiento con el nivel de NGAL en la muestra basal, no abarcando la presente invención la etapa (iii).

Un aspecto más de la invención proporciona un método para identificar el grado de lesión renal crónica en un mamífero a lo largo del tiempo, de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende las etapas de: i) proporcionar en un primer momento al menos una primera muestra de un fluido corporal de un mamífero que no presenta una lesión renal aguda, seleccionándose el fluido corporal del grupo que consiste en plasma y suero; ii) detectar (p.ej. determinar) el nivel de NGAL en la primera muestra (p.ej. empleando un anticuerpo contra NGAL); iii) proporcionar al menos una muestra posterior del fluido corporal del mamífero en un momento posterior al primer momento; iv) detectar (p.ej. determinar) el nivel de NGAL en la al menos una muestra posterior (p.ej. empleando un anticuerpo contra NGAL); y v) determinar el grado de lesión renal crónica en el mamífero a lo largo del tiempo en función de la comparación del nivel de NGAL en la al menos una muestra posterior con el nivel de NGAL en la primera muestra.

Normalmente, el sujeto mamífero es un ser humano. Cuando se proporciona más de una muestra posterior, normalmente, se proporcionan desde el sujeto de manera intermitente y en momentos previamente determinados que oscilan entre uno y más días y una o más semanas, uno o más meses, uno o más años. Se pueden emplear también otros regímenes de muestreo.

Normalmente, se evalúa también al sujeto mamífero para determinar si éste presenta otra afección que pueda aportar al nivel de NGAL en la muestra, incluyéndose entre dichas afecciones, pero sin limitarse solo a ellas, infección vírica o bacteriana, inflamación aguda, lesión aguda o crónica de otro órgano y un cáncer. Normalmente, dichas otras afecciones no tienen efecto ni causan lesión en el riñón. Sin embargo, dichas afecciones pueden aportar por sí mismas a la cantidad de NGAL en el torrente sanguíneo, y en algunos casos en la orina, haciendo que sea difícil distinguir este NGAL del NGAL que se expresa como resultado directo de una lesión renal crónica. Hay otros tipos de afecciones que pueden tener efecto en los altos niveles de NGAL y que pueden sobrecargar la concentración de NGAL que resulta de la lesión renal crónica.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1 muestra los niveles de NGAL urinarios según la etiología de los pacientes con ERC.

FIG. 2 muestra el logaritmo (log) de NGAL y la creatinina en suero en pacientes que avanzaron hacia una fase terminal.

FIG. 3 muestra el log de NGAL y la creatinina en suero en pacientes que no avanzaron hacia una fase terminal.

FIG. 4 muestra el log de NGAL y la relación de proteína con respecto a creatinina en la orina en pacientes que avanzaron hacia una fase terminal.

FIG. 5 muestra el log de NGAL y la relación de proteína con respecto a creatinina en la orina en pacientes que no avanzaron hacia una fase terminal.

FIG. 6 muestra una curva de Kaplan-Meier para la NGAL urinaria.

FIG. 7 muestra una curva de Kaplan-Meier para la proteína urinaria.

FIG. 8 muestra la asociación entre la NGAL urinaria y el porcentaje de fibrosis intersticial en una biopsia de riñón.

FIG. 9 muestra la correlación entre los niveles de NGAL en suero y los niveles de cistatina C en una población de pacientes con ERC.

5

FIG. 10A muestra la correlación entre la cistatina C y la creatinina en suero en la población de pacientes con ERC.

FIG. 10B muestra la correlación entre la cistatina C y eTFG en la población de pacientes con ERC.

10 FIG. 10C muestra la correlación entre el logaritmo natural (ln) de NGAL y la creatinina en suero en la población de pacientes con ERC.

FIG. 10D muestra la correlación entre el ln de NGAL y la eTFG en la población de pacientes con ERC.

15 FIG. 11A muestra la correlación entre la cistatina C y la TFG medida en la población de pacientes con ERC.

FIG. 11B muestra la correlación entre el ln de NGAL y la TFG medida en la población de pacientes con ERC.

FIG. 11C muestra la correlación entre la eTFG y la TFG medida en la población de pacientes con ERC.

20

FIG. 12A muestra los análisis de las características de funcionamiento del receptor (ROC) para la cistatina C en suero para un límite de TFG de 60 ml/min/1,73 m².

FIG. 12B muestra los análisis ROC para la NGAL en suero para un límite de TFG de 60 ml/min/1,73 m².

25

FIG. 12C muestra los análisis ROC para la eTFG para un límite de TFG de 60 ml/min/1,73 m².

Descripción detallada de la invención

30 *Definiciones:*

A no ser que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que normalmente entienden los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención.

35

Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "lesión celular tubular renal crónica", "enfermedad renal progresiva", "insuficiencia renal crónica" (o IRC), "enfermedad renal crónica" (o ERC), "enfermedad de riñón crónica" (o ERC), "Lesión renal crónica" así como otras expresiones sinónimas, son todas ellas, "lesión renal crónica". Lesión renal crónica incluye cualquier afección, disfunción o lesión del riñón que: (a) se produce durante un período de tiempo prolongado o gradual (p.ej. por lo menos semanas, meses, años o décadas) durante el cual varía la tasa de cambio de la lesión, (b) se manifiesta como una disminución prolongada o gradual de la función celular tubular o la tasa de filtración glomerular (TFG) durante la cual varía la tasa de cambio de la función o la tasa, y/o (c) se manifiesta como un empeoramiento prolongado o gradual de la lesión celular tubular renal durante el cual puede variar la tasa de cambio de la lesión. La lesión renal crónica es distinta de cualquier afección, disfunción o lesión del riñón provocada por un evento repentino o que termina rápidamente (p.ej. que ocurre instantáneamente, o en el transcurso de segundos, minutos, horas o días). En particular, una lesión renal crónica es distinta de cualquier afección, disfunción o lesión aguda del riñón, (1) incluyendo pero sin limitarse solo a ellos, insuficiencia renal aguda ("IRA") y (2) por ejemplo, los que se abordan y detectan a través de los ensayos, métodos y kits basados en NGAL que se explican en los documentos US 2004/0219603, US 2005/0272101, PCT WO 2005/121788 y PCT WO 2004/88276.

40

45

50

Tal como se utiliza en el presente documento, una lesión renal crónica incluye o está causada (por ejemplo, pero sin limitarse solo a ellas) infección crónica, inflamación crónica, glomerulonefritis, enfermedad vascular, nefritis intersticial, un fármaco (p.ej. un agente contra el cáncer u otra medicina), una toxina, traumatismo, un cálculo renal, hipertensión crónica, diabetes, insuficiencia cardíaca congestiva, nefropatía por anemia de células falciformes y otras discrasias sanguíneas, nefropatía relacionada con hepatitis, VIH, parvovirus y virus BK (un poliomavirus humano), enfermedad renal quística, malformación congénita, obstrucción, tumor maligno, enfermedad renal de causa indeterminada, nefritis lúpica, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis membranoproliferativa, esclerosis glomerular focal, enfermedad por cambios mínimos, crioglobulinemia, vasculitis (ANCA)-positiva asociada a anticuerpos contra citoplasma de neutrófilos, vasculitis ANCA-negativa, amiloidosis, mieloma múltiple, enfermedad de depósito de cadenas ligeras, complicaciones de trasplante de riñón, rechazo crónico a trasplante de riñón, nefropatía crónica de aloinjerto y efecto crónico de inmunosupresores.

55

60

La expresión "estado de lesión renal crónica", tal como se utiliza en el presente documento significa una evaluación o diagnóstico de la presencia y/o grado de la lesión renal crónica en un mamífero. Esto incluye, sin limitarse solo a ello, por ejemplo, cualquier diagnóstico clínico de la lesión renal crónica o la ausencia del mismo, cualquier

65

diagnóstico basado en la guía K/DOQI y cualquier evaluación mediante la aplicación de la presente invención y basada en el nivel de NGAL en la muestra del organismo para caracterizar al mamífero como poseedor de una “función renal normal”, “lesión renal crónica leve” o “lesión renal crónica avanzada”.

5 Tal como se utiliza en el presente documento “enfermedad renal progresiva”, “empeoramiento de la enfermedad renal” “lesión renal crónica avanzada”, “enfermedad renal crónica avanzada”, “lesión renal progresiva”, “empeoramiento de la lesión renal”, así como otras expresiones sinónimas, se refieren a un estado de lesión renal en el que la lesión puede avanzar rápidamente o empeorar hacia una insuficiencia renal y normalmente, indica una hospitalización inmediata y/o tratamiento de la lesión renal para mejorar o aliviar la función renal.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones lesión o daño renal o del riñón “temprano” o “subclínico” se refiere a un daño o lesión renal que se produce antes del ascenso de la creatinina en suero o incluso antes del desarrollo de proteinuria urinaria.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “aproximadamente” se refiere a alrededor de una aproximación +/-10% del valor señalado. Las palabras “un” y “uno(a)” hacen alusión a “uno(a) o más”.

El término “órgano” se refiere a una estructura biológica diferenciada formada por células y tejidos que realizan una función o funciones determinadas en el organismo.

20 Un “mamífero” o “sujeto mamífero”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un animal de sangre caliente, p.ej. del que se obtiene una muestra de orina. Entre los ejemplos de mamíferos se incluyen, sin limitarse a ellos, seres humanos, primates no humanos, cerdos, gatos, perros, roedores, conejos, caballos, ovejas, ganado, cabras y vacas. Los métodos según la invención son particularmente adecuados para seres humanos.

25 “Mejora”, tal como se utiliza en el presente documento en el contexto de los métodos de la invención, se refiere a cualquier descenso cuantificable de la cantidad de NGAL (p.ej. el nivel de NGAL) o disminución o inversión de los síntomas u otra evidencia fisiológica de la lesión renal crónica (p.ej. basada en la TFG, en los niveles de creatinina en suero, en los niveles de secreción de proteína y similares).

30 “Empeoramiento”, tal como se utiliza en el presente documento en el contexto de los métodos de la invención, se refiere a cualquier aumento cuantificable de la cantidad de NGAL (p.ej. nivel de NGAL) o aumento de los síntomas u otra evidencia fisiológica de lesión renal crónica (p.ej. basada en la TFG, en los niveles de creatinina en suero, en los niveles de secreción de proteína de la orina y similares).

35 *1. NGAL EN EL RIÑÓN Y NGAL CIRCULANTE COMO BIOMARCADORES*

Las nefronas producen NGAL en el riñón como respuesta a una lesión epitelial tubular y es un marcador de lesión tubulointersticial (TI). Se ha establecido bien que, en la insuficiencia renal aguda (IRA) a partir de isquemia o nefrotoxicidad, se elevan los niveles de NGAL en la orina de los enfermos, incluso después de una isquemia renal “subclínica” leve, a pesar de tener niveles de creatinina en suero normales. Tal como se describe en el presente documento, el riñón con diversas etiologías de enfermedad renal crónica, expresa NGAL en el riñón y los niveles de NGAL en riñón en la orina elevados pronostican en gran medida una insuficiencia renal progresiva. Por tanto, tal como se describe a continuación, se ha evaluado NGAL en un estudio longitudinal, como un biomarcador no invasivo del inicio temprano del deterioro de la función renal en pacientes con enfermedad renal crónica y se ha comparado con biomarcadores del avance de la enfermedad de riñón probados. Asimismo, se ha llevado a cabo una serie de estudios de patologías con el fin de evaluar las características de la expresión de NGAL en el riñón dañado.

50 Se ha demostrado anteriormente que la expresión de NGAL en el riñón aumenta notablemente en los túbulos renales tan pronto como aparece la lesión isquémica o nefrotóxica, en modelos tanto animales como humanos. Rápidamente la NGAL del riñón segrega hacia la orina, donde se puede detectar y medir fácilmente, y precede a la aparición de cualquier otro marcador conocido en la orina o en el suero de lesión isquémica. NGAL es resistente a las proteasas, lo que indica que se puede recuperar en la orina como un biomarcador fiable de la expresión tubular de NGAL. Asimismo, en la orina de un riñón sano no aparece NGAL procedente desde fuera del riñón, por ejemplo, filtrada desde la sangre (denominada en adelante “agrupación extra-renal” o NGAL o NGAL “circulante”), sino que más bien la recoge cuantitativamente el túbulo proximal. Dadas estas características, los autores de la invención propusieron anteriormente la NGAL en el riñón como un biomarcador urinario predictivo de insuficiencia renal aguda (véase, p.ej. la Solicitud de Patente DE ESTADOS UNIDOS 2004/0219603 y la Solicitud de patente PCT WO 2004/88276). Los autores de la invención han demostrado anteriormente que la NGAL en el riñón es 100% específica y 99% sensible para el desarrollo de IRA tras cirugía cardíaca en pacientes pediátricos. En un estudio de pacientes adultos sometidos a revisión cardíaca se han obtenido datos similares.

65 Se ha demostrado anteriormente que tras una lesión isquémica o nefrotóxica, la NGAL se expresa en el sistema circulatorio en modelos tanto animales como humanos. Se cree que dicha “NGAL circulante” es una respuesta indirecta a la lesión de las células tubulares renales y se cree que se expresa en el hígado u otro órgano como respuesta a la lesión de la célula tubular renal. Dado que en modelos animales con lesión celular tubular renal se ha

demostrado que la vena renal no contiene niveles de NGAL o niveles insignificantes de NGAL, parece ser que la orina y el suero sostienen diferentes agrupaciones de NGAL, pudiendo ser cualquiera de ellos factores predictivos de lesión de célula tubular renal, y en particular, de lesión isquémica y nefrotóxica, así como de lesión crónica.

5 Al mismo tiempo que NGAL en el riñón o NGAL circulante pueden ser factores predictivos de insuficiencia renal aguda, se ha observado ahora y se ha demostrado, tal como se describe en el presente documento, que también son factores predictivos de lesión renal temprana o sub-clínica y del empeoramiento de la función renal en la
10 enfermedad renal crónica. Teniendo en cuenta la duplicación de la incidencia y frecuencia de la enfermedad renal crónica que se espera en el mundo, así como el coste que representa la atención clínica de la enfermedad renal crónica que se espera en el mundo, así como el coste que representa la atención clínica de la
15 enfermedad renal crónica, es ventajoso identificar tanto NGAL en el riñón o en circulación, o ambas, como biomarcador que se puede utilizar para predecir qué pacientes se encuentran en situación de un elevado riesgo de avance de la enfermedad renal, de manera que se puedan iniciar intervenciones terapéuticas tempranas y que se puedan analizar regímenes médicos a tiempo. La presente invención proporciona, entre otras cosas, una mejor comprensión de las implicaciones biológicas y clínicas de NGAL en el riñón y circulante en pacientes con enfermedad renal crónica.

Un beneficio importante que puede conferir la identificación de daño renal subclínico, es la capacidad de iniciar una intervención temprana (p.ej. tratamientos y/o procedimientos médicos) para promover la conservación y/o la restauración de la función renal. Se ha demostrado anteriormente que la presencia y el nivel de NGAL en suero o en
20 orina, tiene lugar y se eleva antes que la creatinina en suero en modelos de insuficiencia renal aguda, tanto en ratones como en seres humanos, y puede ser elevado incluso cuando no es evidente el daño tubular por lo cambios de la creatinina en suero, como por ejemplo después de dosis sub-terapéuticas de cisplatino.

NGAL es un polipéptido secretado pequeño que es resistente a la proteasa y, en consecuencia, se detecta fácilmente en la orina y el suero, como resultado de una lesión crónica de la célula tubular renal, normalmente, en proporción directa con el grado y la gravedad de la lesión. El aumento gradual de los niveles de NGAL en el riñón y en la circulación de pacientes con insuficiencia renal crónica durante un período de tiempo prolongado diagnostica el empeoramiento de la enfermedad de riñón. Dicho aumento de NGAL precede o está correlacionado con otros indicadores del empeoramiento de la insuficiencia renal crónica urinarios y circulantes, tales como un aumento de la creatinina en suero, un aumento de la secreción de proteína urinaria y una tasa de filtración glomerular más baja (TFG). La detección apropiada del empeoramiento (o mejora, si se ha instituido el tratamiento) del estado renal a lo largo del tiempo, confirmada por los niveles de NGAL previos y posteriores al tratamiento en el paciente, puede ayudar al facultativo a diseñar y/o mantener un régimen de tratamiento apropiado para frenar o detener el avance de insuficiencia renal crónica. Por ejemplo, en necrosis tubular aguda (NTA), en la que se ha estudiado principalmente NGAL del riñón, su elevación anticipa la de creatinina en suero 24-48 horas antes. En la presente invención, se ha determinado que la NGAL en el riñón también se eleva antes que la creatinina en suero en los casos de enfermedad renal crónica. Asimismo, la NGAL en el riñón se expresa como respuesta a la lesión de la célula tubular renal y se excreta hacia la orina. Simultáneamente, NGAL circulante se expresa extra-renalmente hacia el torrente sanguíneo. Normalmente, se excreta NGAL a una concentración mayor en la orina que en la sangre para un evento concreto.

40 El muestreo de NGAL urinaria es ventajoso por no ser invasivo. Existe una correlación positiva entre la concentración de la NGAL en el riñón en la orina y la creatinina en suero, lo que indica una asociación entre los niveles de NGAL y grado de daño tubular. En la presente invención, se determina a través de estudios clínicos y patológicos rigurosos que la presencia de NGAL en el riñón puede señalar un daño de riñón temprano y ayudar a detectar el avance de
45 daño renal crónico causado por una enfermedad progresiva.

El muestreo de NGAL circulante es ventajoso como muestreo sanguíneo, ya que ha sido y sigue siendo un procedimiento clínico de rutina y las muestras de sangre de individuos han sido almacenadas y continúan almacenándose y conservándose fácilmente, proporcionando así una valiosa base de datos de muestras históricas que se pueden utilizar para predecir el avance de lesión renal crónica en determinados pacientes.

Los niveles de NGAL se pueden medir en pacientes sometidos a regímenes terapéuticos con los que se controla la tensión arterial, la glucosa en sangre, la hipertensión renal y las dietas que limitan el consumo de proteínas, todas ellas terapias conocidas por reducir la tasa de avance de enfermedad renal crónica. Los niveles de NGAL se pueden
55 medir durante el transcurso del tratamiento para glomerulonefritis activa o glomerulopatía, que son enfermedades crónicas de los compartimentos intersticial renal y tubular renal. Los niveles de NGAL deberían descender normalmente durante la terapia para nefritis lúpica, glomerulonefritis membranoproliferativa, glomerulonefritis membranosa, glomerulosclerosis focal, enfermedad de cambios mínimos, crioglobulinemia y nefropatía relacionada con hepatitis, VIH, parvovirus y virus BK. Se miden los niveles de NGAL y normalmente descienden durante el tratamiento para nefrotoxicidad relacionada con cadmio y plomo, urato, quimioterapia. Asimismo, se miden los niveles de NGAL y descienden normalmente durante el tratamiento de enfermedad renal quística medular y poliquística, así como para diabetes e hipertensión.

65 a. Expresión de NGAL en riñones normales

Los autores de la invención han realizado un estudio exhaustivo de NGAL en seres humanos, ratones y ratas con

función renal normal y con enfermedad renal aguda. Los autores de la invención han observado que NGAL se secreta normalmente a la circulación a través del hígado y el bazo y es filtrada a través de los glomérulos y recuperada después por el túbulo proximal. En este punto, NGAL se degrada en lisosomas (de 23 kDa a 14 kDa) y se liberan los ligandos localizados en el cáliz de NGAL. La captura de NGAL circulante, no en el riñón, del túbulo proximal, es muy efectiva, por poca NGAL que se encuentre en la orina de los seres humanos y ratones, si es que se encuentra alguna [en seres humanos: carga filtrada = (21 ng/ml NGAL circulante) x (TFG), mientras que la NGAL urinaria = 22 ng/ml. En los ratones: carga filtrada = (100 ng/ml NGAL circulante) x (TFG), mientras que la NGAL urinaria = 40 ng/ml]. Incluso tras la sobrecarga masiva de proteína NGAL mediante inyecciones sistémicas de NGAL (1 mg), se recupera poca proteína en la orina. Es probable que la captación en el túbulo proximal refleje la acción de megalina. Esto se puede comprobar en un ratón nulo para megalina que contiene un marcado aumento en la orina de la NGAL inyectada. Tan solo se encuentra una pequeña cantidad de NGAL degradada (14 kDa) en la orina, lo que refleja el procesamiento dentro del riñón. Los autores de la invención calcularon un $t_{1/2}$ plasmático ~ 10 min que probablemente tiene como resultado aclaramiento renal. Estos datos subrayan la especificidad de NGAL urinaria (NGAL recuperada de la orina) como biomarcador de NGAL expresada en el riñón.

b. Expresión de NGAL en Modelos de Insuficiencia renal aguda

En enfermedades agudas, tales como septicemia y en intervenciones quirúrgicas, incluyendo isquemia del riñón, los niveles de NGAL circulante se multiplican por 10^3 - 10^4 . Los autores de la invención han observado anteriormente que las biopsias de riñón humano con insuficiencia renal aguda presentaban vesículas NGAL inmunopositivas. Se trata supuestamente de vesículas endocíticas y están co-localizadas con marcadores de lisosomas. Por tanto en el riñón normal, al igual que en la insuficiencia renal aguda, parece ser que el grupo extra-renal de NGAL suministra la proteína al túbulo proximal donde se captura.

Hay que destacar que NGAL circulante protege la función renal incluso después de un modelo de isquemia grave. NGAL filtrada induce hemo-oxigenasa 1 en el túbulo proximal, una enzima crucial que mantiene la viabilidad del túbulo de cara a diferentes tipos de tensiones, lo que indica un mecanismo de protección.

Además de la "agrupación extra-renal" de NGAL (reflejada en la captura de NGAL del túbulo proximal), los epitelios del riñón también expresan la proteína NGAL. En un riñón sano normal, existe una expresión residual en los túbulos distales. Sin embargo, al cabo de 2-6 horas de pinzamiento transversal de la arteria renal o del uréter de ratones, ratas, cerdos, o de los riñones de pacientes que padecen una insuficiencia renal aguda, el propio túbulo renal expresa NGAL. A través de PCR en tiempo real, los autores de la invención encontraron que el ARNm de NGAL se multiplicaba por 10^3 . A través de hibridación *in situ* en el riñón del ratón, los autores de la invención encontraron que la isquemia inducía expresión masiva de ARN de NGAL en la rama gruesa ascendente del asa de Henle.

Igualmente, la obstrucción urinaria induce la expresión masiva de ARNm de NGAL en los conductos colectores. En la orina de ratones, cerdos y seres humanos se detectó un aumento de proteína NGAL de 10^3 a 10^4 veces más. Un cálculo de la excreción fraccional de NGAL en NTA (necrosis tubular aguda) humana fue a menudo mayor que uno ($EF_{NGAL} > 1$), lo que confirma que NGAL urinaria reflejó la síntesis local en lugar de la filtración desde la sangre. Este fue el caso también en pacientes con insuficiencia renal prolongada que iniciaban la terapia de reemplazo renal. La cantidad de NGAL urinaria fue tan prodigiosa en estos pacientes y su respuesta a los cambios en la función renal tan rápidos que los autores de la invención han utilizado NGAL urinaria como un marcador sensible y como un factor predictivo de insuficiencia renal aguda en niños y en adultos sometidos a procedimientos cardíacos.

Los datos muestran que, además de la "agrupación extra-renal" de NGAL, eliminada por el túbulo proximal, el epitelio renal expresa cantidades masivas (agrupación "intra-renal") de NGAL que son secretadas a la orina. NGAL urinaria es un marcador específico y sensible de lesión epitelial aguda y es de hecho un marcador reversible. El tratamiento de riñón isquémico de ratón con NGAL no solo negó la elevación del nivel de creatinina sino que también redujo en un 70% la expresión del mensaje NGAL intra-renal (riñón).

c. Expresión de NGAL en un Modelo de Enfermedad Renal Crónica

Cabe destacar que la orina de pacientes con insuficiencia renal crónica presentó un contenido mucho mayor de NGAL que el presente en el suero (incluso cuando se corrigió el nivel de creatinina en la orina). Esto indica que NGAL no solamente refleja cambios agudos en el compartimiento tubulointersticial, sino también enfermedad crónica. Asimismo, se encontró que NGAL es una de las proteínas más expresadas en 4/5 modelos de nefrectomía de enfermedad renal crónica en dos líneas de animales diferentes. Estos datos preliminares indican que, a un nivel patológico, NGAL es un fuerte marcador de ERC.

d. NGAL en el riñón distinguible de NGAL circulante

Se realizó un análisis del punto isoeléctrico (pI) de NGAL de riñón aislada de la orina de pacientes con IRA y ERC, y se comparó con el punto isoeléctrico de NGAL aislada de neutrófilos (es decir, NGAL circulante). NGAL circulante tenía un pH de 8,5 – 9,2, mientras que NGAL de riñón de IRA y ERC tuvo un pI más complejo de 6,9, 8,2 y 8,8-9,2. Esto indica que el NGAL de riñón y NGAL circulante se glicosilan de manera distinta y, por tanto, proceden de

fuentes diferentes. Esto corrobora la hipótesis de que NGAL de riñón es generada por el túbulo renal como respuesta a la lesión, en cambio NGAL circulante es generada por otro órgano como respuesta a la misma lesión.

5 El hecho de distinguir NGAL de riñón de la NGAL circulante en un fluido corporal puede ser útil para el diagnóstico de cualquier lesión renal, así como su grado. La NGAL que se encuentra en la orina es predominantemente NGAL de riñón, si bien puede incluir cierta proporción y nivel de NGAL circulante, que se filtra normalmente y se reabsorbe completamente en un riñón sano, pero que se puede filtrar hacia la orina en un riñón dañado. En consecuencia, cualquier NGAL urinaria predice una lesión renal.

10 2. MÉTODOS NGAL SEGÚN LA INVENCIÓN

El ensayo de NGAL se puede realizar en una muestra de fluido corporal de un mamífero cualquiera. Un sujeto mamífero que presenta lesión renal aguda tendrá presente normalmente en la orina y en el torrente sanguíneo una cantidad o un nivel significativos de proteína NGAL, que puede sobrecargar la presencia del NGAL que esté presente en el fluido corporal como consecuencia de una lesión renal subclínica o una lesión renal crónica estable. Por consiguiente, la práctica de la presente invención implica la selección o identificación de un sujeto mamífero que no presenta una lesión renal aguda. Normalmente, el profesional clínico o facultativo puede determinar clínicamente si un sujeto presenta o no una lesión renal aguda a través de medios perfectamente conocidos en la técnica, tales como exclusión de eventos recientes como cirugías, isquemia, deshidratación, septicemia y uso de nefrotoxina.

20 La NGAL medida puede tener su origen no solamente en las células del túbulo renal dañado, sino también en los neutrófilos circulantes. Por ejemplo, se ha demostrado que los niveles de NGAL en suero aumentan en situaciones clínicas inflamatorias, como infecciones víricas o bacterianas graves, peritonitis aguda grave y exacerbaciones pulmonares agudas de fibrosis quística. Dada la posibilidad de expresión de NGAL de neutrófilos, en particular en el torrente sanguíneo, normalmente, se evalúa clínicamente al sujeto también para determinar si presenta otra afección que pueda aportar significativamente al nivel de NGAL en la muestra. Dicha afección puede incluir, sin limitarse solo a ellas, infección vírica o bacteriana aguda, inflamación aguda, incluyendo epitelios inflamados, una lesión crónica o aguda de otro órgano y cáncer. En general, cada una de estas afecciones se puede identificar en un sujeto a través de una evaluación clínica normal y por lo general no están asociadas con la lesión renal.

30 Puede haber enfoques alternativos para evaluar una muestra de suero o plasma extraída de un sujeto que tiene cierto nivel de NGAL aportado por neutrófilos circulantes activados o por alguna otra afección no relacionada con lesión renal. Un enfoque consiste en tratar de sustraer una cantidad pronosticada de NGAL aportada por dicha fuente del nivel total de NGAL. Otro enfoque consiste en establecer un nivel mínimo u otro nivel predeterminado, con expectativas de excluir muestras de afecciones que no tienen el efecto de lesión renal o que la causen.

40 Por otra parte, un sujeto mamífero con una infección vírica o bacteriana aguda o una inflamación aguda, normalmente, tendrá presente en el torrente sanguíneo una mayor cantidad o nivel de proteína NGAL, que puede ocultar o sobrecargar la presencia de NGAL presente en el suero o el plasma como consecuencia de una lesión renal crónica sub-clínica, estable o avanzada. Por consiguiente, la práctica de la presente invención implica la selección o identificación de un sujeto mamífero que no presenta una infección vírica o bacteriana aguda o una inflamación aguda que pueda elevar el nivel de NGAL circulante de la sangre. Alternativamente, con el dato de que el sujeto presenta una infección vírica o bacteriana aguda en algún grado, el profesional clínico o el médico puede incluir como factor la aportación de NGAL circulante al nivel total de NGAL determinado cuando se evalúa el estado de lesión renal. Normalmente, el profesional clínico o el médico puede determinar clínicamente si el sujeto presenta o no una inflamación o infección vírica o bacteriana aguda a través de los medios perfectamente conocidos en la técnica (p.ej. recuento de glóbulos blancos, cultivo bacteriano y similares).

50 Asimismo, un sujeto que presente una lesión crónica o aguda de otro órgano diferente al riñón, tendrá normalmente expresada y presente en el torrente sanguíneo una mayor cantidad o nivel de proteína NGAL, que puede ocultar o sobrecargar la presencia de cualquier NGAL presente en el suero o plasma como consecuencia de una lesión renal crónica sub-clínica, estable o avanzada. Por consiguiente, la práctica de la presente invención implica la selección o identificación de un sujeto que no presenta una lesión crónica o aguda de otro órgano diferente al riñón, que pueda elevar el nivel de NGAL circulante en la sangre. Alternativamente, con el dato de que el sujeto presenta una lesión crónica o aguda de otro órgano en algún grado, el profesional clínico o el médico puede incluir como factor dicha aportación de NGAL circulante en el nivel de NGAL total determinado cuando se evalúa el estado de lesión renal. Normalmente, el profesional clínico o el médico pueden determinar clínicamente si el sujeto presenta o no una lesión crónica o aguda de otro órgano diferente del riñón a través de los medios perfectamente conocidos en la técnica.

60 Asimismo, si bien se ha demostrado que un riñón sano puede eliminar de manera eficaz y cuantitativa NGAL circulante del torrente sanguíneo, se desconoce cómo afecta a este papel un riñón lesionado crónicamente, y la acumulación resultante (gradual o rápida) de NGAL circulante en suero.

65 a. Muestreo de fluido corporal

En la técnica se conocen métodos para recoger, manipular y tratar la orina, la sangre, el suero y el plasma, así como

otros fluidos. Normalmente, aunque no es necesario, se pueden tomar dos o más muestras consecutivas o posteriores de un fluido corporal a través de medios similares, como el momento del día, la cantidad de muestra extraída o recogida y de medios de manipulación y tratamiento de la muestra.

5 Dependiendo de las circunstancias, incluyendo el nivel de NGAL en la muestra y el estado clínico del paciente, se pueden tomar muestras del fluido corporal del sujeto de forma diaria, semanal o a lo largo de varias semanas, o mensualmente o a lo largo de varios meses, semestralmente, o anualmente o en los intervalos intermedios. Se puede repetir el muestreo en un período de tiempo después del tratamiento para detectar cualquier cambio en el estado de lesión renal crónica y para identificar el grado de lesión renal crónica a lo largo del tiempo. El muestreo no
10 tiene por qué ser continuo, sino que puede ser intermitente (p.ej. esporádico). El período de tiempo comprendido entre los intervalos del muestreo intermitente está dictado por la afección del sujeto y puede oscilar entre una muestra tomada de forma continua y una muestra tomada cada diez años.

b. Lesión de la célula tubular renal o estado de lesión renal

15 El estado de salud del riñón de un sujeto se puede diagnosticar evaluando o comparando el nivel de NGAL determinado en una muestra de fluido corporal. El estado de la célula tubular renal del sujeto se puede evaluar en función de la presencia de NGAL en el fluido corporal simplemente, tal como se determina mediante ensayo u otro medio de detección. El estado de lesión de la célula tubular renal del sujeto se puede evaluar además en función del
20 nivel de NGAL en el fluido corporal tal como se detecta o se determina mediante un ensayo u otro medio de detección.

El estado de lesión de la célula tubular renal del sujeto se evalúa no solamente en función de los niveles de NGAL sino también en ausencia de una lesión renal aguda o una infección vírica o bacteriana aguda, inflamación aguda o
25 lesión crónica o aguda de otro órgano, según se determina a través de una evaluación clínica. Dichas afecciones se evalúan clínicamente en el momento de la muestra inicial y las muestras posteriores. De igual modo, se evalúan las co-morbilidades, medicaciones y eventos primarios o secundarios que tienen lugar entre las muestras de NGAL y se incluye como factor los efectos en los resultados del muestreo.

30 Se observó que los niveles de NGAL determinados en las muestras de orina y en las muestras de suero se correspondían por lo general con el nivel determinado de otros biomarcadores conocidos y aceptados para la enfermedad o lesión renal crónica, encontrados en la muestra del sujeto, incluyendo creatinina en suero, cistatina C, y eTFG. El nivel de NGAL determinado puede expresarse como el estado de lesión renal del paciente, junto con otros factores como el nivel de NGAL de los sujetos antes de la muestra, el período de tiempo comprendido entre las
35 sucesivas muestra o entre un evento y el momento de la muestra y cualquier evaluación clínica de lesión renal aguda, infección vírica o bacteriana aguda, inflamación aguda y lesión de otro órgano.

Los niveles de NGAL específicos en una muestra de suero y en una muestra de orina descritos a continuación se determinan aplicando los métodos ELISA NGAL descritos en el Ejemplo 1a (SUERO) y 1b (ORINA),
40 respectivamente. Las determinaciones de los niveles de NGAL en las muestras de suero y orina utilizando dichos métodos ELISA deberían producir resultados similares. Debe entenderse que la determinación de los niveles de NGAL en las muestras de suero y orina utilizando un ensayo o una metodología de ensayo diferente, puede dar como resultado un nivel de NGAL absoluto, diferente, en la muestra. Por consiguiente, la invención incluye niveles de NGAL para evaluar la lesión renal, determinados por un ensayo diferente, que sean equivalentes a los niveles de
45 NGAL descritos en el presente documento, utilizando los métodos ELISA NGAL descritos en el ejemplo 1a (SUERO) y 1b (ORINA).

Tal como se describe en el presente documento, un nivel de hasta un límite base de NGAL comprendido normalmente entre 0 y aproximadamente 40 ng/ml, más normalmente de aproximadamente 20 ng/ml, en una
50 muestra de orina de un sujeto mamífero que no presenta otra enfermedad, trastorno o afección que pudiera elevar los niveles de NGAL en la orina (p.ej. lesión renal aguda o infección renal) indica una función renal sana del sujeto. Asimismo, niveles de NGAL por encima de un límite intermedio, normalmente comprendidos entre aproximadamente 35 ng/ml y aproximadamente 60 ng/ml en la orina y, más normalmente, de aproximadamente 45 ng/ml, y hasta un límite superior comprendido normalmente entre aproximadamente 120 ng/ml y aproximadamente 150 ng/ml, indican
55 un estado de lesión renal crónica sub-clínico o estable. Asimismo, niveles de NGAL en el límite superior o por encima de él (p.ej. superiores a aproximadamente 120 ng/ml, aproximadamente 135 ng/ml, aproximadamente 140 ng/ml, aproximadamente 155 ng/ml, aproximadamente 160 ng/ml, aproximadamente 170 ng/ml, aproximadamente 180 ng/ml, aproximadamente 190 ng/ml o aproximadamente 200 ng/ml) suelen indicar un estado de lesión renal crónico avanzado o en empeoramiento, y/o un mayor riesgo de avanzar hacia una insuficiencia renal crónica.

60 Tal como se describe en el presente documento, un nivel de hasta el límite base de NGAL comprendido normalmente entre 0 y aproximadamente 40 ng/ml y más normalmente de aproximadamente 20 ng/ml en una muestra de suero (o plasma) de un sujeto mamífero que no presenta otra enfermedad, trastorno o afección que pudiera elevar los niveles de NGAL en suero (p.ej. lesión renal aguda, infección vírica o bacteriana aguda, inflamación aguda, lesión crónica o aguda de algún otro órgano o cáncer) indica una función renal sana de dicho
65 sujeto. Asimismo, los niveles de NGAL en el límite intermedio o por encima de él comprendidos normalmente entre

aproximadamente 35 ng/ml y aproximadamente 60 ng/ml (o nivel equivalente en plasma) y más normalmente de aproximadamente 45 ng/ml, y hasta un límite superior comprendido normalmente entre aproximadamente 150 ng/ml y aproximadamente 250 ng/ml indica un estado de lesión renal crónica sub-clínico o estable. Asimismo, niveles de NGAL en el límite superior o por encima de él (p.ej. más de aproximadamente 150 ng/ml, aproximadamente 160 ng/ml, aproximadamente 170 ng/ml, aproximadamente 180 ng/ml, aproximadamente 190 ng/ml, aproximadamente 200 ng/ml, aproximadamente 210 ng/ml, aproximadamente 220 ng/ml, aproximadamente 230 ng/ml o más) suelen indicar un estado de lesión renal crónica avanzado o en empeoramiento, y/o un mayor riesgo progresión hacia una insuficiencia renal crónica.

En otro método de ensayo más del estado renal, se puede establecer una correlación entre el nivel de NGAL determinado en una muestra de orina, suero o plasma de un sujeto que tiene la función renal sana o un grado de lesión renal, tal como se ha descrito anteriormente, y la TFG para evaluar la fase de la enfermedad renal crónica. El nivel de la tasa de filtración glomerular (TFG) está comúnmente aceptado como la mejor medida global de la función renal en pacientes sanos y enfermos. Tanto los profesionales sanitarios como los pacientes están familiarizados con el concepto de que "el riñón es como un filtro". La TFG es la mejor medida de la capacidad de los riñones para filtrar la sangre y, por tanto, de su función. Por consiguiente, una correlación entre el nivel de NGAL en la orina, el suero y el plasma y la TFG establecería a NGAL como un excelente biomarcador que puede predecir el resultado de la TFG de los sujetos y, por lo tanto, ayudar a pronosticar y a diagnosticar el estado de lesión renal de los sujetos y servir de ayuda para orientar las opciones de intervención y tratamiento.

En la Tabla 1 se muestra una correlación entre la TFG y la fase de ERC. Se ha demostrado que existe una buena correlación entre el nivel de NGAL en suero y la TFG, en particular en un paciente con ERC avanzada (es decir, un paciente que tiene una fase de ERC superior o con un valor TFG inferior (<30)).

TABLA 1		
FASE	DESCRIPCIÓN	TFG (ml/min/1,73 m ²)
(cero)	Con mayor riesgo	≥90 (con factores de riesgo ERC)
1	Daño renal con TFG normal a alta	> 90
2	Daño renal con TFG levemente reducida	60-89
3	TFG reducida moderada	30-59
4	TFG reducida grave	15-29
5	Insuficiencia renal	< 15 (o diálisis)

Se ha demostrado también que existe una correlación entre NGAL, tal como se proporciona en el presente documento, y el nivel de cistatina C. Dado que una medida exacta de la TFG es un prerrequisito principal para la identificación del estado de lesión renal, y para la estadificación y tratamiento de ERC, NGAL emerge como un biomarcador destacable para la evaluación de la lesión renal y su avance y da cabida a terapias e intervenciones más a tiempo y mejoradas.

A la vista de una población cada vez mayor de sujetos humanos que tienen una fase temprana de ERC, se sigue necesitando un mejor seguimiento y registro del nivel de biomarcadores de ERC temprana a lo largo del ciclo vital de la población humana. La presente invención proporciona un medio para obtener un perfil histórico de los niveles de NGAL en suero, plasma y orina, que puede, después, ayudar al paciente y al médico a identificar los eventos y los factores del estilo de vida que pueden afectar adversamente, o mejorar, la salud renal. Se puede evaluar a los individuos que, aunque tal vez no tengan una lesión renal crónica, se encuentran en un mayor riesgo, p.ej. debido a factores del estilo de vida o a eventos causantes de lesión, como parte de una revisión clínica de rutina, en función de los valores de NGAL en sus fluidos corporales.

A medida que se deteriora la salud renal del sujeto hacia una ERC sub-clínica, se deberían realizar evaluaciones más frecuentes basadas en ensayos de muestras más frecuentes y ensayos de los niveles de NGAL de las mismas. Las evaluaciones más frecuentes, a su vez, pueden acelerar una evaluación de la raíz de la lesión renal crónica y una intervención terapéutica más temprana diseñada para mejorar la salud renal y frenar el deterioro de la salud renal causada por la lesión renal crónica.

La presente invención también es particularmente útil para valorar y evaluar un programa terapéutico para el tratamiento de una ERC. El médico responsable puede prescribir pruebas periódicos en las que se tomen muestras a lo largo del tratamiento terapéutico o después de él, y más normalmente periódicamente después de un tratamiento terapéutico, con el fin de evaluar el cambio en el estado renal como resultado del tratamiento.

3. OTRAS CONSIDERACIONES DE LA DETERMINACIÓN DE NGAL EN EL RIÑÓN

La presente invención emplea la detección de un biomarcador NGAL en métodos.

En general, la detección de NGAL según la invención se basa en la formación de un complejo de NGAL y un anticuerpo contra NGAL (denominado anticuerpo de captura) y, a continuación, la detección opcional de la NGAL poniendo en contacto el complejo con un segundo anticuerpo para detectar el biomarcador o el anticuerpo de captura. El anticuerpo detectable se puede marcar con un marcador detectable o con un medio de detección, tal como un marcador radioactivo, una enzima, un colorante biológico, una perla magnética o biotina, como se conoce bien en la técnica.

Normalmente, según la invención, la etapa de detección (p.ej. determinación) de la cantidad (nivel o concentración) de NGAL en la muestra de suero o plasma comprende: poner en contacto la muestra de suero o plasma con un anticuerpo para NGAL para permitir la formación de un complejo anticuerpo-NGAL y determinación de la cantidad del complejo anticuerpo-NGAL. La cantidad de complejo anticuerpo-NGAL es una función de la cantidad de NGAL en cada muestra. La etapa de poner en contacto la muestra de fluido con un anticuerpo para NGAL para permitir la formación del complejo anticuerpo-NGAL implica normalmente la etapa de poner en contacto la muestra con un medio (p.ej. un soporte sólido o una fase sólida) sobre el que se fija el anticuerpo.

Normalmente, la etapa de determinar la presencia o cantidad del complejo anticuerpo-NGAL en la muestra de fluido corporal implica poner en contacto el complejo con un segundo anticuerpo para detectar NGAL. Más allá, esta etapa puede incluir opcionalmente las etapas de: separar el material no unido de la muestra del complejo anticuerpo-NGAL, poner en contacto el complejo anticuerpo-NGAL con un segundo anticuerpo para NGAL para permitir la formación de un complejo NGAL-segundo anticuerpo, separar el segundo anticuerpo sin unir del complejo NGAL-segundo anticuerpo y determinar en la muestra la cantidad de complejo NGAL-segundo anticuerpo, siendo la cantidad del complejo NGAL-segundo anticuerpo en la muestra una función de la cantidad de complejo anticuerpo-NGAL en la muestra.

Todavía más allá, la etapa de determinación de la cantidad del complejo NGAL-segundo anticuerpo en la muestra puede incluir métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo las etapas de: añadir a la muestra peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con estreptavidina para formar un complejo con el complejo NGAL-segundo anticuerpo, añadir a la muestra sustrato de peróxido colorante para hacerlo reaccionar con la HRP-conjugada con estreptavidina y generar un producto teñido, y a continuación, leer la intensidad del color del producto teñido con un lector de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), siendo la intensidad del color una función de la cantidad del complejo NGAL-segundo anticuerpo en la muestra.

Además del ensayo ELISA NGAL, tal como se describe en los ejemplos, se pueden utilizar otros métodos de análisis que proporcionen especificidad, sensibilidad y precisión satisfactorias, y pueden incluir un dispositivo de flujo lateral y una varilla. Por ejemplo, se recubre la superficie de una varilla con un anticuerpo de captura para NGAL, y se utiliza un anticuerpo de detección en contra marcado con enzima para detectar NGAL que se une con el anticuerpo de captura. En general, de acuerdo con la presente invención, se puede diseñar y utilizar cualquier ensayo de unión en el que se apliquen los principios descritos en el presente documento y que se conozca en la técnica para detectar y llevar un control de NGAL. En particular, se puede confeccionar un método y un kit para detectar el biomarcador NGAL adaptando los métodos y kits conocidos en la técnica para la rápida detección de otras proteínas y ligandos en una muestra biológica. Entre los ejemplos de métodos y kits que se pueden adaptar en la presente invención se incluyen los descritos en la patente de Estados Unidos No. 5.656.503, publicada por May col. el 12 de agosto de 1997, la patente de Estados Unidos No. 6.500.627, publicada por O'Conner y col. el 31 de diciembre de, 2002, la patente de Estados Unidos No. 4.870.007, publicada por Smith-Lewis el 26 de septiembre de 1989, la patente de Estados Unidos No. 5.273.743, publicada por Ahlem y col. el 28 de diciembre de 1993, y la patente de Estados Unidos No. 4.632.901, publicada para Valkers y col. el 30 de diciembre de 1986.

En los métodos de la presente invención son útiles los anticuerpos tanto monoclonales como policlonales que se unen a NGAL. Los anticuerpos están disponibles en el mercado o se pueden preparar a través de métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales para NGAL se describen por ejemplo en "Characterization of two ELISAs for NGAL, a newly described lipocalin in human neutrophils", Lars Kjeldsen y col., (1996) Journal of Immunological Methods, Vol. 198, 155-16. Entre los ejemplos de anticuerpos monoclonales para NGAL disponibles en el mercado se incluyen los obtenidos a través de Antibody Shop, Copenhague, Dinamarca, como por ejemplo, HYB-211-01, HYB-211-02, y NYB-211-05. Normalmente, se pueden utilizar HYB-211-01 y HYB-211-02 con NGAL en sus formas reducida y no reducida. En "An Iron Delivery Pathway Mediated by a Lipocalin", Jun Yang y col., Molecular Cell, (2002), Vol. 10, 1045-1056, se describe un ejemplo de anticuerpo policlonal para NGAL. Para preparar dicho anticuerpo policlonal, se inmunizaron conejos con proteína NGAL filtrada con gel recombinante. Se incubaron los sueros con perlas 4B GST-sefarosa para separar los contaminantes, produciendo los anticuerpos policlonales en suero tal como describieron los autores de la solicitud en Jun Yang y col., Molecular Cell (2002).

De igual modo, se puede preparar NGAL purificada de diversas formas (p.ej. NGAL humana recombinante) para su uso como material normalizado y de calibración, tal como se conoce en la técnica (p.ej. tal como describen Kjeldsen y col., (1996)) o está disponible en el mercado.

Los medios utilizados en los métodos de la invención (p.ej. soporte sólido o fase sólida) pueden consistir en cualquier soporte adecuado utilizado en análisis inmunoquímicos, p.ej. incluyendo pero sin limitarse solo a ellos, superficie o partículas de poliestireno, policloruro de vinilo o polietileno. Opcionalmente, los medios (p.ej. el soporte sólido o la fase sólida) incluyen uno o más electrodos para facilitar la detección en función de las interacciones electroquímicas (p.ej. patente de Estados Unidos No. 6.887.714).

Un kit para su uso en el método de la invención comprende normalmente un medio (p.ej. un soporte sólido o una fase sólida) en la que se fija el anticuerpo de captura, en virtud de lo cual se pone en contacto la muestra de fluido corporal (p.ej. muestra de orina, suero o plasma) con el medio para exponer el anticuerpo de captura a NGAL contenido en la muestra. El kit incluye un medio de adquisición que puede estar formado por una herramienta, como por ejemplo una espátula o un filamento simple con una superficie que comprende los medios. El medio de adquisición también puede estar formado por un recipiente para aceptar la muestra de fluido corporal, teniendo dicho recipiente una superficie de contacto con la muestra de fluido que comprende el medio. En otro modo de realización típico, el ensayo para detectar el complejo de la NGAL y el anticuerpo puede comprender un ELISA y se puede utilizar para cuantificar la cantidad de NGAL en una muestra de fluido corporal. En un modo de realización alternativo, el medio de adquisición puede estar formado por una herramienta que consiste en un casete que contiene el medio. En todos estos casos, sin embargo, un kit incluye normalmente instrucciones para su uso así como cualquier otra información adicional relacionada con los componentes del kit (p.ej. almacenamiento, seguridad y demás información).

Alternativamente, los métodos de la presente invención se pueden adaptar para su uso en sistemas automáticos o semi-automáticos (incluyendo aquellos en los que la fase sólida consiste en una micropartícula), tal como se describen, p.ej. en las patentes de Estados Unidos. Nos. 5.089.424 y 5.006.309, así como p.ej. los comercializados por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) incluyendo pero sin limitarse solo a ellos Abbott's ARCHITECT®, AxSYM, IMX, PRISM, Quantum II, así como otras plataformas.

Se describe un kit para su uso en la detección temprana de lesión renal crónica en un mamífero, basada en la evaluación de la muestra de fluido corporal (p.ej. orina o suero) de un sujeto que comprende uno o más de los siguientes: 1) un medio para adquirir una cantidad de una muestra de fluido corporal (p.ej. un recipiente o vial de recogida de muestra); 2) un medio en el que se fija un anticuerpo de captura capaz de formar complejo con NGAL (p.ej., una varilla o una placa de microtitulación); 3) componentes de ensayo para la detección de un complejo de NGAL y el anticuerpo de captura (p.ej. anticuerpo de detección, solución de lavado, soluciones de incubación, soluciones de detección, calibradores, controles y similares); 3) instrucciones del kit; y 4) otros datos bibliográficos que describan los componentes del kit. Además, el medio de adquisición de muestra de fluido corporal opcionalmente (a) comprende el medio sobre su superficie de contacto con el fluido corporal y/o (b) comprende una herramienta que comprende un casete que contiene los medios.

El kit consiste opcionalmente en un kit de centro de atención (*point-of care*). En dicho kit de centro de atención, el medio de adquisición comprende opcionalmente una herramienta que consiste en una varilla, comprendiendo la superficie de la varilla los medios. Asimismo, en un kit de centro de atención, el ensayo comprende opcionalmente un ensayo colorimétrico con varilla

Además, se proporciona un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para determinar un estado de lesión renal crónica en un sujeto mamífero, que comprende opcionalmente un primer anticuerpo específico para NGAL para detectar su presencia en una muestra de fluido corporal del sujeto. Dicho kit puede emplearse óptimamente cuando la muestra de fluido corporal (p.ej. una muestra de orina, suero o plasma) comprende una cantidad de fluido de aproximadamente 1 mililitro o menor

La invención se entenderá mejor con los ejemplos que ilustran su uso y eficacia. A continuación, se exponen los Ejemplos de la presente invención, a modo ilustrativo y sin limitarla.

Ejemplos:

Ejemplo 1: ENSAYOS Y MÉTODOS

a. ELISA NGAL - SUERO

A no ser que se especifique de otra forma, el nivel de NGAL en suero se determina con un ELISA del siguiente modo. Se recubren placas de microtitulación durante toda la noche a 4 °C, con un anticuerpo monoclonal de ratón generado contra NGAL humana (NoHYB211-05, Antibody Shop, Gentofte, Dinamarca). Todas las etapas posteriores se llevan a cabo a temperatura ambiente. Se bloquean las placas con tampón que contiene BSA al 1%, se recubren con 100 µl de suero o lo habitual (concentraciones de NGAL comprendidas entre 1 y 1000 ng/ml) y se incuban con un anticuerpo monoclonal biotinilado contra NGAL humana (NoHYB211-01B, Antibody Shop) seguido de HRP conjugada con avidina (Dako, Carpintería, California, Estados Unidos.). Se añade sustrato TMB (BD Biosciences, San José, CA) para el revelado del color, cuya lectura se realiza al cabo de 30 min a 450 nm con un lector de microplaca (Benchmark Plus, BioRad, Hercules, California, Estados Unidos). Los coeficientes de variación inter- e

intra-ensayo son de 5-10%. Todas las medidas se realizan por triplicado y en modo oculto. Se mide NGAL en suero como ng/ml y se puede expresar como valores log-transformados.

b. ELISA NGAL - URINE (Ejemplo de referencia)

5 A no ser que se especifique de otro modo, el nivel de NGAL se determina en la orina con un ensayo ELISA del siguiente modo. Se recubren placas de microtitulación durante toda la noche a 4 °C con un anticuerpo monoclonal de ratón generado contra NGAL humana (NoHYB211-05, Antibody Shop, Gentofte, Dinamarca). Todas las etapas posteriores se llevan a cabo a temperatura ambiente. Se bloquean las placas con tampón que contiene BSA al 1%,
 10 se recubren con 100 µl de orina (centrifugada) o lo normal (concentraciones de NGAL comprendidas entre -1000 ng/ml) y se incuban con anticuerpo monoclonal biotinilado contra NGAL humana (NoHYB211-01B, Antibody Shop), seguido de HRP conjugada con avidina (Dako, Carpintería, California, Estados Unidos.), se añade sustrato de TMB (BD Biosciences, San José, CA) para el revelado de color, cuya lectura se realiza al cabo de 30 minutos a 450 nm
 15 de variación inter- e intra-ensayo son de 5-10%. Todas las medidas se realizan por triplicado y en modo oculto. La NGAL urinaria (riñón) se mide como ng/ml y se puede expresar como valores log-transformados.

c. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

20 Se utiliza una prueba t o una prueba de suma de rangos de Mann-Whitney de dos muestras para comparar las variables continuas. Las variables categóricas se comparan utilizando una prueba de Chi cuadrado o una prueba exacta de Fisher. S Las asociaciones entre variables se evalúan mediante un análisis de correlación de Pearson. La comparación entre correlaciones se realiza aplicando pruebas estadísticas Z de Steiger creando puntuaciones Z a partir de los coeficientes de correlación. El análisis residual se realiza para evaluar la concordancia entre las
 25 diferentes variables de predicción (creatinina en suero, eTFG, NGAL y cistatina C) y la TFG medida. Para medir la sensibilidad y la especificidad para NGAL y cistatina C en suero a diferentes puntos de corte de TFG, se generan curvas características de funcionamiento del receptor ROC utilizando un programa SAS MACRO y en el análisis se utiliza el paquete estadístico SAS 9.1. El área bajo la curva (AUC) se calcula para establecer la calidad de NGAL y cistatina C como biomarcadores. Un AUC de 0,5 no es mejor de lo esperado por azar, en cambio un valor de 1,0
 30 significa un biomarcador perfecto. A no ser que se especifique de otro modo, los valores se presentan como una media ± DT. Un valor de $P \leq 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

Ejemplo de referencia 2:

35 (a) Expresión de NGAL urinaria en una población de pacientes con ERC

Los niveles de NGAL urinaria se evaluaron en 91 pacientes ambulatorios de la clínica de nefrología general del Columbia University Medical Center (CUMC) que fueron remitidos por nefrólogos externos a consulta para el
 40 tratamiento. Eran pacientes con enfermedad renal como resultado de diversas etiologías. En la Tabla 2, a continuación, se muestran sus características basales. La edad promedio fue de 49,2 años y cerca de la mitad de la cohorte eran mujeres. Se determinó el coeficiente de correlación entre NGAL y otros parámetros continuos por transformación log de NGAL, junto con la creatinina en suero, la relación de la albúmina con respecto a la creatinina en la orina (UACR) y el total de proteína urinaria. Se observó una correlación entre el log NGAL y el log de creatinina en suero en la visita basal ($r = 0,54$, $p < 0,0001$), el cambio de creatinina en suero entre la visita basal y la de
 45 seguimiento ($r = 0,49$, $p = 0,002$), TFG ($r = -0,22$, $p = 0,04$), log UACR ($r = 0,55$, $p < 0,0001$), y el log del total de proteína urinaria ($r = 0,61$, $p = < 0,0001$). No existió correlación entre la NGAL urinaria y la edad (DT 17,0=, la presión arterial sistólica (DT 15,8), la presión arterial diastólica (DT 11,6), el peso (DT 24,1) y la albúmina en suero (DT 4,3).

Datos demográficos	Valor
Edad (años - Media)	49,2
Mujeres (%)	47,8
Raza (%)	
Blanca	73,9
Negra	10,2
Hispana	4,6
Asiática	8,0
Otras	3,4
Parámetros clínicos	
Presión arterial sistólica (mmHg - media)	135,4
Presión arterial diastólica (mmHg - media)	81,6
Peso (kg - media)	83,3

	Valor
Datos demográficos	
Parámetros de laboratorio	
NGAL en orina (g/ml - media)	94,6
Proteína en orina aislada (mg/gm - media)	3,2
Relación de albúmina/creatinina en la orina (mg/mg - media)	2.338,6
Creatinina en suero (mg/dl - media)	2,6
Albúmina en suero (g/dl - media)	4,2
TFG estimada (ml/minuto - media)	46,4

5 La Tabla 3 enumera las etiologías de ERC en esta cohorte. De los 91 pacientes, únicamente 81 tuvieron diagnósticos asignados. Las etiologías de ERC consistieron en 38% glomerulonefritis, 44% síndrome nefrótico y 17% otras causas. La media del nivel de NGAL urinaria para todos los pacientes fue 94,6 ng/ml de orina. Los niveles de NGAL urinaria medios según la etiología de ERC fueron 71,2 ng/ml para el grupo con glomerulonefritis, 101,7 ng/ml para el grupo con síndrome nefrótico y 78,2 ng/ml para el grupo con otras etiologías de enfermedad renal (véase FIG. 1). Dichos niveles no fueron estadísticamente diferentes entre sí según ANOVA (prueba F = 0,6890).

	Porcentaje
Síndrome nefrótico (n=31)	
Enfermedad relacionada con anticardiolipina	3,2
Nefropatía C1q	3,2
Glomerulonefritis crónica (GN)	6,5
GN Fibrilar	3,2
GN por inmunocomplejos	3,2
Nefropatía por IgA	42,0
GN membranoproliferativa	6,5
Glomerulonefritis rápidamente progresiva(RPGN)	3,2
Nefritis lúpica	29
Síndrome nefrótico (n=36)	
Amiloide	2,8
Glomerulosclerosis Focal y segmentaria (FSGS)	47,2
Enfermedad de cambios mínimos	16,7
Nefropatía membranosa	30,6
Nefrótico no especificado	2,8
Otros (n=14)	
ERC no especificada	28,5
Nefropatía diabética	28,6
Toxicidad por litio	14,3
Enfermedad renal poliquística	28,6

10 b. Expresión de NGAL urinaria y su relación con el estado de avance de la enfermedad renal

15 En la Tabla 4 se muestran las características basales de los pacientes estratificados en progresión según un criterio de valoración primario de un aumento del 25% o más de la creatinina en suero o el desarrollo de enfermedad renal en fase terminal en torno a la siguiente visita de seguimiento. Se obtuvo información de seguimiento de 82 pacientes de los 91 de origen. Dieciocho pacientes (22,0%) de la cohorte alcanzaron el criterio de valoración primario. La NGAL urinaria (o "del riñón") media para los pacientes que alcanzaron la fase terminal fue 294,6 ng/ml, mientras que para los que no alcanzaron la fase terminal el nivel de NGAL fue 46,6 ng/ml ($p < 0,0001$). El grupo de pacientes que avanzaron hacia una fase terminal también tuvieron una proteinuria media significativamente más alta y una TFG media significativamente más baja.

20

Tabla 4: Características de la población según el estado de avance

	Personas que presentan avance		Personas sin avance		valor de p
	n	se	n	se	
<u>Datos demográficos</u>					
Edad (años - Media)	16	54,4	64	49,4	2,15 0,3
Mujeres (%)	10	55,6	29	45,3	0,6
Raza (%)					0,2
Blanca	12	70,6	48	76,2	
Negra	1	5,9	6	9,5	
Hispana	0	0	4	6,4	
Asiática	4	23,5	3	4,8	
Otros	0	0	2	3,2	
<u>Parámetros clínicos</u>	16	141,3	63	133,7	1,97 0,1
Presión arterial sistólica (mmHg - media)	16	83,3	63	81,0	1,56 0,3
Presión arterial diastólica (mmHg-media)	15	81,4	62	83,8	3,24 1,0
Peso (kg - media)					
Enfermedad renal					0,6
<u>Diagnóstico</u>	4	26,7	25	42,4	
Síndrome nefrítico (%)	8	53,3	23	39,0	
Síndrome nefrótico (%)	3	20,0	11	18,6	
Otros (%)					
<u>Parámetros de laboratorio</u>					
NGAL en orina (m/dl - media)	18	294,6	64	46,6	10,90 <0,0001
Proteína en orina aislada (mg/gm - media)	7	10,2	43	2,2	0,06 0,004
Creatinina en suero (mg/dl -media)	18	4,8	63	2,0	0,16 0,0001
Albúmina en suero (g/dl - media)	13	3,4	58	4,4	0,65 0,2
TFG estimada (ml/minuto - media)	15	29,0	62	49,3	3,86 0,001

5 A continuación, se construyeron modelos de regresión lineal para evaluar la relación entre la NGAL urinaria y la función renal y la proteinuria, estratificando después el resultado. En dichos modelos, se realizó la transformación logarítmica de los valores de NGAL, creatinina en suero y el AUCR para normalizar las propiedades distribucionales de los datos. En la Tabla 5, se enumeran los coeficientes de regresión. Hubo una relación lineal significativa entre el log NGAL y el log creatinina en suero solamente para los pacientes que avanzaron hacia la fase terminal.

Tabla 5: Coeficientes de regresión para Log NGAL y parámetros del riñón

Variable	Personas que presentan avance	se	valor de p	Personas que no presentan avance	se	valor de p
Log Creatinina en suero	0,28	0,1	0,01	0,23	0,1	0,1
Total Proteinuria	-0,07	0,02	0,03	16,4	3,3	< 0,0001
Log UACR	0,32	0,23	0,2	0,49	0,1	< 0,0001

10 Tal como se observa en la FIG.2, en los pacientes en los que existió un avance, existe una asociación lineal significativa en dirección positiva entre NGAL y los niveles de creatinina ($R^2 = 0,3382$). Tal como se observa en la FIG. 3, el diagrama de puntos confirma la asociación no significativa de los niveles de NGAL y la creatinina en suero

en las personas que no presentaron un avance ($R^2 = 0,0364$). Dicho de otro modo, es muy bueno que las personas que presentan un avance tengan niveles de NGAL, ya que se añaden como información de pronóstico a la creatinina en suero.

5 Para la proteinuria total, los modelos de regresión demostraron una asociación inversa significativa entre la proteinuria total y el log NGAL en pacientes que alcanzaron la fase terminal (FIG. 4 [$R^2 = 0,6300$] y FIG. 5 [$R^2 = 0,0634$]). Hubo una relación lineal entre log NGAL y log UACR únicamente en los pacientes que no avanzaron hacia la fase terminal.

10 c. NGAL pronostica un futuro deterioro de la función renal

La elevación de la NGAL urinaria entre los pacientes que alcanzaron la fase terminal condujo a la hipótesis de que NGAL puede ser un factor predictivo independiente del deterioro de la función renal. Se llevó a cabo un análisis de la sensibilidad tanto para NGAL urinaria como para la proteína urinaria, un importante factor predictivo de insuficiencia renal progresiva. Se seleccionó como criterio de valoración primario un aumento del 25% de la creatinina en suero o el desarrollo de insuficiencia renal en estado terminal en el momento del seguimiento. El área bajo la curva (AUC) para NGAL fue 0,908 y el de la proteinuria fue 0,833. A continuación, se definió el valor extremo superior o límite superior del nivel de NGAL que dio la mejor sensibilidad y especificidad para NGAL y proteinuria total. A una concentración de NGAL de 120 ng/ml, la sensibilidad fue 83,3% y la especificidad fue 85,9% para pronosticar el desarrollo de una función renal más deficiente en la visita de seguimiento. Para el total de proteína urinaria, un límite de 1 gramo diario demostró una sensibilidad de 85,7% y una especificidad de 81,4%. Se construyeron curvas de Kaplan-Meier utilizando este límite tanto para NGAL como para proteinuria (FIGS. 6 y 7). Tal como se muestra en la FIG. 6, la mediana de tiempo de supervivencia para el desarrollo de criterio de valoración primario fue 125 días en el grupo con una NGAL urinaria ≥ 120 ng/ml ($p < 0,0001$). No hubo diferencia en las curvas de supervivencia para el grupo y con proteinuria y sin ella, según se define a través del límite de 1 gm diario (FIG. 7, $p = 0,3$).

Tabla 6: Modelos de riesgo para la asociación de los niveles de NGAL con Enfermedad Renal Progresiva			
Modelos de riesgo proporcional de una variable	Razón de riesgo	valor de p	
NGAL (> 120 mg/dl)	12,4	0,001	
Creatinina en suero (mg/dl)	1,6	0,002	
TFG (ml/minuto)	1,0	0,2	
Proteinuria > 1 gramo)	3,1	0,3	
Hipertensión (SBP ≥ 140 o DBP ≥ 90)	2,7	0,1	
Modelos de riesgo proporcional con múltiples variables	Razón de riesgo	valor de p	
NGAL (> 120 mg/dl)	8,4	0,01	
Creatinina en suero (mg/dl)	1,2	0,2	

La exploración posterior según modelos de regresión del riesgo proporcional reveló que un valor límite superior de 120 ng/ml de NGAL urinaria fue el único factor predictivo independiente que permaneció asociado significativamente con el empeoramiento de la función renal en el seguimiento en un modelo de múltiples variables (HR 8,4, $p < 0,01$) (Véase la Tabla 6).

d. Criterio de valoración primario alternativo y valor límite para NGAL

35 Utilizando los mismos sujetos, los autores de la invención seleccionaron después un criterio de valoración primaria de un aumento del 50% de la creatinina en suero o la evolución hacia una fase terminal de la enfermedad renal en el momento del seguimiento (122,1 días 45,7 días). Para la creatinina en suero, el área bajo la ROC fue 0,783 y para la proteinuria, el área bajo la curva fue 0,775. Basándose en esto, los autores de la invención establecieron un límite superior arbitrario de 150 ng NGAL/ml de orina, que proporcionó un valor razonable de sensibilidad (0,75), especificidad (0,88), valor predictivo positivo (0,63) y valor predictivo negativo (0,93) para identificar el máximo número de sujetos que evolucionaron hacia una insuficiencia renal crónica. La sensibilidad y especificidad para NGAL medidas en ng/mg de creatinina fueron 0,75 y 0,84, respectivamente.

e. NGAL y su relación con fibrosis en la biopsia de riñón

45 Con el fin de evaluar la relación entre los niveles de NGAL urinaria y el grado de fibrosis en la biopsia de riñón, los autores de la invención examinaron los resultados de las puntuaciones de fibrosis en 16 muestras de ensayo de la biopsia de riñón de una cohorte de 91 pacientes. Se seleccionaron estas 16 muestras porque habían sido leídas por el departamento de patología renal del CUMC. Estas biopsias se obtuvieron hasta 2 años antes que el nivel de NGAL en la orina. El análisis de regresión indicó que había una buena correlación entre los niveles de NGAL

obtenidos hasta 2 años después de la biopsia renal y el porcentaje de fibrosis en la biopsia (figura 8, $r^2 = 0,53$, $p < 0,001$). Los autores de la invención piensan que esto indica que los niveles de NGAL en la orina son un reflejo de la cronicidad del daño renal. Si esto es verdad, entonces se trata de una confirmación patológica de su utilidad para predecir resultados renales deficientes. En conjunto, estos datos indican un avance innovador y de alto impacto en el descubrimiento y caracterización de NGAL como un marcador de predicción del avance de una enfermedad renal crónica.

Ejemplo 3: RESULTADOS DE ESTUDIOS DEL PACIENTE (SUERO)

10 a. Expresión de NGAL circulante en una población de pacientes con ERC

Se reclutó prospectivamente a 45 niños y adolescentes consecutivos (edades 6-21 años) con fases 2-4 de ERC (TFG medida = 15-89 ml/min/1,73 m²) entre 2002 y 2004. Las fases de ERC se definieron con arreglo a la guía K/DOQI. Ninguno de los sujetos recibió trasplante de riñón durante el estudio ni recibió trasplante posterior. Se revisaron los registros médicos para consultar los datos demográficos, las causas y la duración de ERC, así como las medicaciones.

Se midieron los niveles de creatinina en suero utilizando un ensayo espectrofotométrico de reflectancia cinético (Vitros® 950 Chemistry System from Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, Nueva Jersey, Estados Unidos.) como parte de la atención de rutina. La TFG estimada (eTFG) se calculó utilizando la fórmula de Schwartz. Asimismo se determinó la función renal en el momento de la admisión en el estudio midiendo la TFG utilizando una sola inyección intravenosa de Ioversol al 74% (Optiray 350®, Mallinckrodt Inc., St Louis, Missouri, Estados Unidos.). Se midió el yodo en muestras de sangre periódicas por análisis por fluorescencia de rayos X (Renalyzer PRX90, Diatron AB Inc, Suecia) y se calculó la TFG desde la pendiente de la curva de desaparición del yodo. Se midió la cistatina C en suero en el momento de la admisión en el ensayo a través de un método inmunonefelométrico consolidado y normalizado (Dade-Behring BN ProSpec System Version 1.1, Marburg, Alemania). Al comparar las medidas de TFG mediante técnicas de trazador nuclear sensible y la cistatina C en suero de 62 pacientes con diversas afecciones renales crónicas, se ha documentado una excelente correlación entre estas técnicas y los coeficientes de variación inter- e intra-ensayos de 5-10% (datos no mostrados). Se realizaron todas las medidas por triplicado y en modo ciego.

Se determinaron los momentos de muestreo en función de la eTFG. Para los sujetos con una eTFG > 60 ml/min/1,73 m², se obtuvieron las muestras a los 150, 195, y 240 minutos, para los que tuvieron una eTFG de 30-60 ml/min/1,73 m², a 150, 240, y 300 minutos y para los que tuvieron una eTFG de < 30 ml/min/1,73 m², a 180, 270, y 360 minutos tras la inyección de Ioversol.

Se midió la NGAL en suero y se analizó estadísticamente en el momento de la admisión en el estudio empleando ELISA NGAL, tal como se describe en la sección Métodos y Ensayos.

Las causas principales de ERC fueron displasia renal /uropatía obstructiva (67%) y enfermedad glomeruloquística (33%). Prácticamente la mitad de los pacientes (46%) estaban tomando medicaciones antihipertensivas. Todos los que tomaban medicación, tomaban inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina (IECA). Cuarenta de los pacientes tomaban una IECA o un bloqueador de receptor de angiotensina como agente anti-proteinúrico. La duración media de la ERC era $8,8 \pm 5,6$ años. Ninguno de los sujetos había padecido la ERC menos de un año. Trece de los pacientes (28%) presentaba una fase 2 de ERC, 19 (42%) una fase 3 y 13 (28%), una fase 4.

No se observó ninguna correlación significativa entre la concentración de NGAL y la de cistatina C en suero y la edad, el peso, la altura, el sexo, la raza o el IMC (todos $P > 0,1$). Sin embargo, sí que se observó una sólida correlación entre los niveles de NGAL y cistatina C (FIG. 9). Por otra parte, hay una gran correlación entre NGAL y cistatina C y la creatinina en suero, eTFG (FIG. 10) y con la TFG medida (FIG. 11). También hubo una correlación entre la TFG medida y eTFG (FIG. 11). La comparación de las correlaciones entre TFG y NGAL frente a la de TFG con cistatina C no fue estadísticamente significativa (prueba de Steiger $P = NS$). Se llevaron a cabo los análisis residuales para evaluar las concordancias entre las variables de predicción y la TFG medida. La diferencia de porcentaje media para el valor de predicción fue $31 \pm 4\%$ para creatinina en suero, $30 \pm 2,6\%$ para cistatina C, $18 \pm 1,9\%$ para eTFG, y $15 \pm 1,0$ para NGAL. El siguiente porcentaje de estimaciones fue detectado también con un 30% del valor de predicción de la TFG medida: 89% de los sujetos para NGAL, 80% para eTFG, 66% para creatinina en suero y 58% para cistatina C.

En las FIGS. 12 y 13 se presentan los análisis de las curvas características de funcionamiento de receptor (ROC). Para un límite de TFG = 60 ml/min/1,73 m², NGAL, cistatina C y eTFG en suero fueron excelente biomarcadores, con una AUC de 0,85, 0,86 y 0,92 respectivamente. Para un límite de TFG = 30 ml/min/1,73 m², la precisión de diagnóstico de cistatina C (AUC = 0,89) fue similar a la de eTFG (AUC = 0,89) y ligeramente mejor que la de NGAL (AUC = 0,73). En la tabla 7 se muestran los puntos de corte para NGAL y la cistatina C para las mejores eficiencias de diagnóstico.

TABLA 7

Variable	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
TFG 30 ml/min/1,73 m ²				
Cistatina C = 1,7 mg/l	92	91	80	97
NGAL = 190 ng/ml (ln NGAL = 5,2 ng/ml)	70	84	64	87
TFG=60 ml/min/1,73 m ²				
Cistatina C = 1,21 mg/l	82	77	90	63
NGAL = 45 ng/ml (ln NGAL = 3,8 ng/ml)	84	77	90	67

Para investigar mejor las relaciones entre los biomarcadores estudiados y la TFG medida, se llevaron a cabo análisis de correlación en diferentes fases de ERC. Para los sujetos con una TFG medida ≥ 30 ml/min/1,73 m² (n=30), se observaron correlaciones significativas para todos los biomarcadores sometidos al ensayo (todos $P < 0,0001$), incluyendo cistatina C ($r = 0,45$), NGAL ($r = 0,52$), creatinina en suero ($r = 0,70$), y eTFG ($r = 0,72$). Sin embargo, para los sujetos con una TFG medida < 30 ml/min/1,73 m² (n = 15), hubo una mayor correlación de NGAL con la TFG medida ($r = 0,62$, $P < 0,0001$), seguido de cistatina C ($r = 0,41$, $P < 0,0001$). No se observó ninguna correlación significativa entre la TFG medida y la creatinina en suero ($r = 0,12$, $P = 0,66$) o eTFG ($r = 0,20$, $P = 0,47$) en esta fase avanzada de ERC.

b. Correlación entre NGAL circulante y otros biomarcadores de ERC conocidos

Este estudio en niños con ERC demostró que (a) característicamente, están presentes niveles elevados de NGAL en suero, (b) existe una estrecha correlación entre NGAL en suero y la cistatina C en suero, la TFG medida y la eTFG, (c) tanto la NGAL como la cistatina C en suero resultan útiles para la cuantificación de ERC, y (d) NGAL supera cistatina C y eTFG a niveles más bajos de TFG medida.

El prerrequisito principal para la identificación y estadificación de ERC es una medida exacta de TFG. En el presente estudio, se calculó la eTFG utilizando la fórmula de Schwartz, así como la cistatina C y NGAL en los análisis de correlación globales y los análisis ROC. No obstante, si bien ROC constituye un método útil para determinar la sensibilidad y la especificidad en puntos de corte específicos, no determina la variabilidad individual del parámetro que se está estudiando. Esto fue especialmente evidente para una eTFG como marcador en los intervalos de TFG medida más bajos (valor de lesión renal más alto), en que tanto la creatinina en suero medida como la eTFG resultaron deficientes. Dichos resultados son los esperados ya que es bien conocido que la fórmula de Schwartz puede sobreestimar la función renal en sujetos con una insuficiencia renal avanzada.

(c) La NGAL circulante es el mejor biomarcador global para ERC

En los sujetos del presente ensayo clínico, la mejor concordancia global con la TGF medida que se encontró fue para NGAL en suero. Si bien fue evidente una concordancia excelente con la TFG medida para todos los biomarcadores sometidos a ensayo en los pacientes con grados moderados de ERC, NGAL superó claramente a la cistatina C y a la eTFG a niveles de TFG de < 30 ml/min/1,73 m² (en grados de ERC avanzados). Los resultados obtenidos por los autores de la invención indican que la determinación de NGAL en suero puede proporcionar una medida precisa adicional de la disfunción renal en ERC, especialmente en sujetos con una ERC avanzada.

Si bien se ha descrito la invención junto con modos de realización preferentes, los expertos en la técnica podrán introducir diversos cambios, sustituciones de equivalentes y alteraciones entorno a la materia objeto expuesta en el presente documento tras la lectura de la memoria descriptiva que precede. Por tanto, la invención se puede poner en práctica de formas distintas a las que se describen de manera específica en el presente documento. Por consiguiente, se pretende que la protección en el presente documento se limite únicamente a las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar el estado de lesión renal crónica en un mamífero que comprende las etapas de:
 - 5 (a) determinar el nivel de NGAL (lipocaína asociada a gelatinasa de neutrófilos) en una muestra de suero o plasma obtenida de un mamífero, no presentando el mamífero ninguna lesión renal aguda, infección bacteriana o vírica aguda, inflamación aguda, lesión crónica o aguda en otro órgano diferente al riñón, ni cáncer, que aporte al nivel de NGAL en la muestra; y
 - 10 (b) evaluar el estado de lesión renal crónica del mamífero en función del nivel de NGAL en la muestra,

en el que el estado de lesión renal crónica consiste en la presencia, ausencia y/o grado de lesión renal crónica en un mamífero, siendo el nivel de NGAL en la muestra de un mamífero que tiene lesión renal crónica, elevado en comparación con el nivel de NGAL en una muestra de un mamífero que tiene una función renal normal.
 - 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que, cuando el nivel de NGAL en la muestra es inferior a un nivel límite base, el estado de lesión renal crónica evaluado indica una función renal normal, opcionalmente, en el que el nivel límite base es de aproximadamente 20 ng NGAL/ml la muestra.
 - 20 3. El método según la reivindicación 1, en el que, cuando el nivel de NGAL en la muestra está en un nivel límite intermedio o por encima de él, y hasta un nivel límite superior, el estado de lesión renal crónica evaluado indica una lesión renal crónica leve, opcionalmente, en el que el nivel límite intermedio es de aproximadamente 45 ng NGAL/ml la muestra, y el nivel límite superior es de aproximadamente 200 ng NGAL/ml la muestra.
 - 25 4. El método según la reivindicación 1, en el que cuando el nivel de NGAL en la muestra está en un nivel límite superior o por encima de él, el estado de lesión renal crónica evaluado indica lesión renal crónica avanzada, opcionalmente, en el que el nivel límite superior es de aproximadamente 200 ng NGAL/ml la muestra.
 - 30 5. El método de la reivindicación 1, utilizado para la detección de cualquier cambio en el estado de lesión renal crónica de un mamífero, en el que la muestra de la etapa (a) es una primera muestra y que comprende además las etapas de:
 - 35 (c) determinar el nivel de NGAL en la al menos una muestra de suero o plasma posterior obtenida transcurrido un período de tiempo desde la obtención de la primera muestra;
 - (d) evaluar cualquier cambio en el estado de lesión renal crónica del mamífero, en función de la comparación del nivel de NGAL en la al menos una muestra posterior con el nivel de NGAL en la primera muestra.
 - 40 6. El método según la reivindicación 5, en el que
 - (a) un nivel de NGAL más alto en la muestra posterior en comparación con la primera muestra, es indicativo de un empeoramiento de la lesión renal crónica del mamífero; o
 - 45 (b) un nivel de NGAL más bajo en la muestra posterior en comparación con la primera muestra, es indicativo de una mejora de la lesión renal crónica del mamífero.
 - 50 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, utilizado para re-evaluar el estado de lesión renal crónica tras un tratamiento para lesión renal crónica en el mamífero, en el que la muestra de la etapa (a) se identifica como una muestra basal, y que comprende además las etapas de:
 - (c) determinar el nivel de NGAL en al menos una muestra de suero o plasma post-tratamiento obtenida del mamífero después de haber proporcionado un tratamiento al mamífero para la lesión renal crónica;
 - (d) re-evaluar el estado de lesión renal crónica del mamífero tras el tratamiento, en función de la comparación del nivel de NGAL en la al menos una muestra post-tratamiento con el nivel de NGAL en la muestra basal.
 - 55
 8. El método según la reivindicación 7, en el que el nivel de NGAL más bajo en la muestra post-tratamiento en comparación con la muestra basal, es indicativo de una mejora de la lesión renal crónica del mamífero.
 - 60 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la lesión renal crónica incluye o está causada por infecciones crónicas, inflamación crónica, glomerulonefritis, enfermedades vasculares, nefritis intersticial, fármacos, toxinas, traumatismo, cálculos renales, hipertensión crónica, diabetes, insuficiencia cardíaca congestiva, nefropatía por anemia de células falciformes y otras discrasias sanguíneas, nefropatía relacionada con hepatitis, VIH, parvovirus y virus BK, enfermedad renal quística, malformación congénita, obstrucción, tumor maligno, enfermedad renal de causa indeterminada, nefritis lúpica, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis membranoproliferativa, esclerosis glomerular focal, enfermedad por cambios mínimos, crioglobulinemia, vasculitis
 - 65

ANCA-positiva, vasculitis ANCA-negativa, amiloidosis, mieloma múltiple, enfermedad de depósito de cadenas ligeras, complicaciones de trasplante de riñón, rechazo crónico a trasplante de riñón, nefropatía crónica de aloinjerto y efecto crónico de inmunosupresores.

- 5 10. El método de las reivindicaciones 3 o 4, utilizado para identificar el grado de lesión renal crónica en un mamífero a lo largo del tiempo, en el que la muestra de la etapa (a) es una primera muestra, y en el que la primera muestra ha sido tomada en un primer momento, que comprende además las etapas de:
- 10 (c) determinar el nivel de NGAL en al menos una muestra de suero o plasma posterior obtenida en un momento posterior al primer momento;
- (d) determinar el grado de lesión renal crónica en el mamífero a lo largo del tiempo en función de la comparación del nivel de NGAL en al menos una muestra posterior con el nivel de NGAL en la primera muestra.
- 15 11. El método para evaluar el estado de lesión renal crónica en un mamífero de la reivindicación 1, en el que:
- (i) un nivel de NGAL en la muestra de suero en el nivel límite intermedio o por encima de él comprendido entre aproximadamente 35 ng NGAL/ml y aproximadamente 60 ng NGAL/ml la muestra de suero, y hasta un nivel límite superior de aproximadamente 150 ng NGAL/ml la muestra de suero, indica una lesión renal crónica subclínica o estable; y
- 20 (ii) un nivel de NGAL en la muestra de suero en el nivel límite superior o por encima de él comprendido entre aproximadamente 150 mg NGAL/ml y aproximadamente 230 ng NGAL/ml de muestra de suero, indica un estado de lesión renal crónica avanzado o empeorado y/o un mayor riesgo de evolución hacia una insuficiencia renal crónica.
- 25 12. El método según la reivindicación 1, en el que el nivel de NGAL en la muestra por debajo del nivel límite base de hasta aproximadamente 40 ng NGAL/ml de muestra, indica una función renal normal, opcionalmente, en el que el nivel límite base es de aproximadamente 20 ng NGAL/ml de muestra.
- 30 13. El método según la reivindicaciones 11-12 en el que el nivel límite intermedio es de aproximadamente 45 ng NGAL/ml de muestra, y el nivel límite superior es de aproximadamente 200 ng NGAL/ml de muestra.
14. El método de las reivindicaciones 11-13, en el que la muestra de la etapa (a) es una primera muestra y comprende además las etapas de:
- 35 (c) determinar el nivel de NGAL en al menos una muestra posterior obtenida del mamífero transcurrido un período de tiempo desde la obtención de la primera muestra; y
- (d) evaluar cualquier cambio en el estado de la lesión renal crónica del mamífero, en función de la comparación del nivel de NGAL en la al menos una muestra posterior, con el nivel de NGAL en la primera muestra.
- 40 15. El método según la reivindicaciones 11-14, en el que un nivel de NGAL más alto en la muestra posterior en comparación con la primera muestra es indicativo del empeoramiento de la lesión renal crónica en el mamífero y un nivel de NGAL más bajo en la muestra posterior en comparación con la primera muestra es indicativo de la mejora del estado de lesión renal crónica en el mamífero.
- 45 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14-15, utilizado para re-evaluar el estado de lesión renal crónica tras el tratamiento para lesión renal crónica en el mamífero, en el que la muestra de suero o plasma de la etapa (a) o la al menos una muestra posterior de suero o plasma de la etapa (c) se identifica como una muestra basal, y que comprende además las etapas de:
- 50 (e) determinar el nivel de NGAL en una muestra de suero o plasma post-tratamiento obtenida del mamífero después de haber proporcionado al mamífero un tratamiento para la lesión renal crónica; y
- 55 (f) re-evaluar el estado de lesión renal crónica del mamífero después del tratamiento, en función de la comparación del nivel de NGAL en la al menos una muestra de suero o plasma post-tratamiento con el nivel de NGAL en la muestra basal.
- 60 17. El método según la reivindicación 16, en el que un nivel de NGAL más bajo en la muestra de post-tratamiento en comparación con la muestra basal, es indicativo de una mejora del estado de lesión renal crónica del mamífero.
- 65 18. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-17, en el que la lesión renal crónica incluye o está causada por infecciones crónicas, inflamación crónica, glomerulonefritis, enfermedades vasculares, nefritis intersticial, fármacos, toxinas, traumatismo, cálculos renales, hipertensión crónica, diabetes, insuficiencia cardíaca congestiva, nefropatía por anemia de células falciformes y otras discrasias sanguíneas, nefropatía relacionada con hepatitis, VIH, parvovirus y virus BK, enfermedad renal quística, malformación congénita, obstrucción, tumor

maligno, enfermedad renal de causa indeterminada, nefritis lúpica, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis membranoproliferativa, esclerosis glomerular focal, enfermedad por cambios mínimos, crioglobulinemia, vasculitis ANCA-positiva, vasculitis ANCA-negativa, amiloidosis, mieloma múltiple, enfermedad de depósito de cadenas ligeras, complicaciones de trasplante de riñón, rechazo crónico a trasplante de riñón, nefropatía crónica de aloinjerto y efecto crónico de inmunosupresores.

- 5
19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el mamífero es un ser humano.
- 10
20. El método según la reivindicación 14, en el que el período de tiempo es al menos unas semanas, o al menos un mes, o al menos unos meses, o al menos semestral, o al menos anual, o cualquier intervalo comprendido entre ellos.

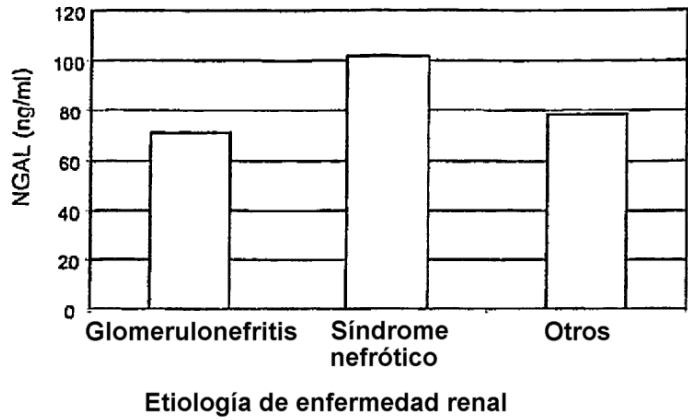


FIG. 1

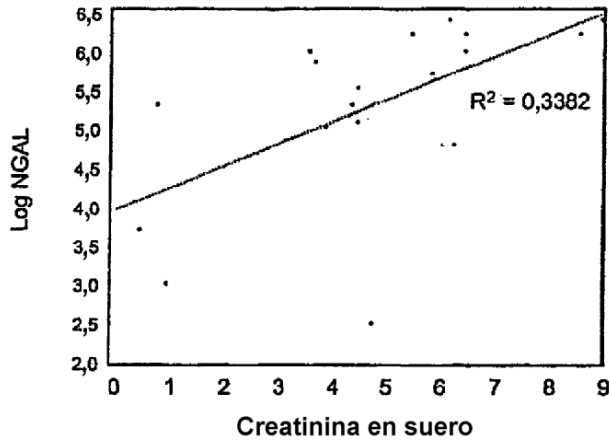


FIG. 2

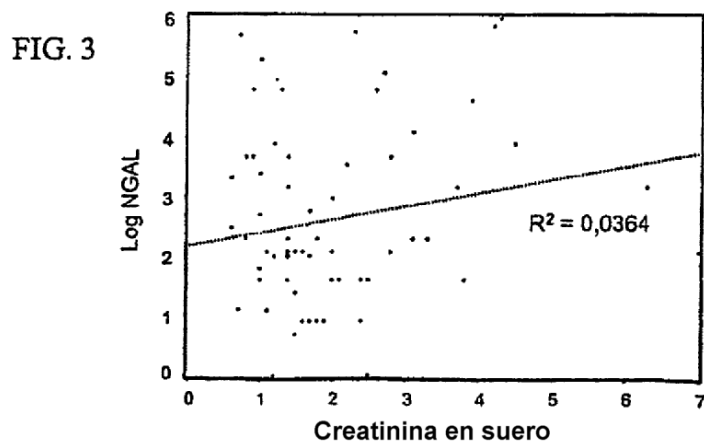


FIG. 3

FIG. 4

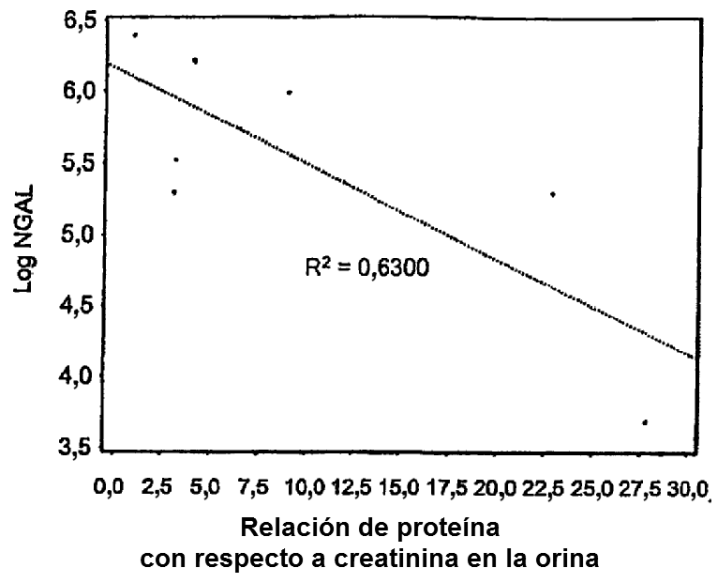
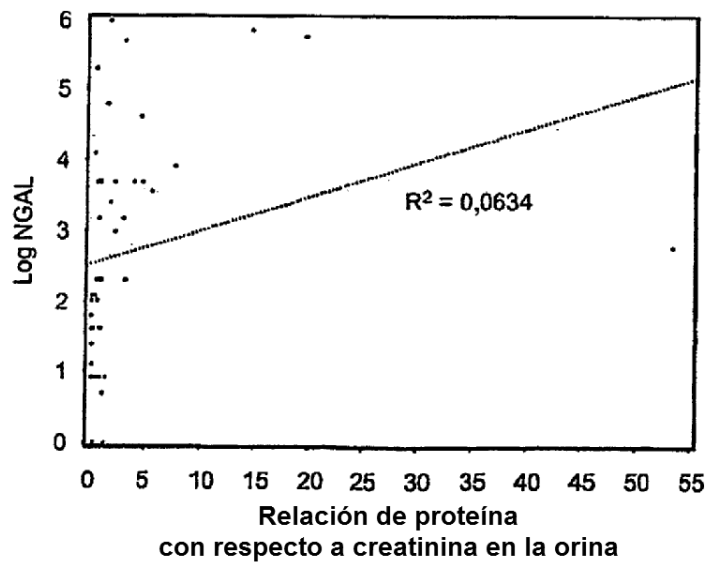


FIG. 5



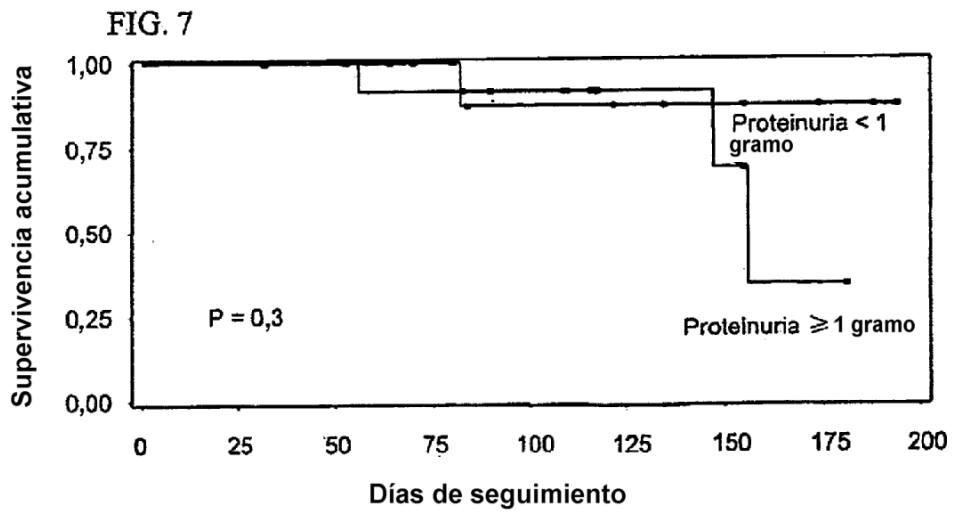
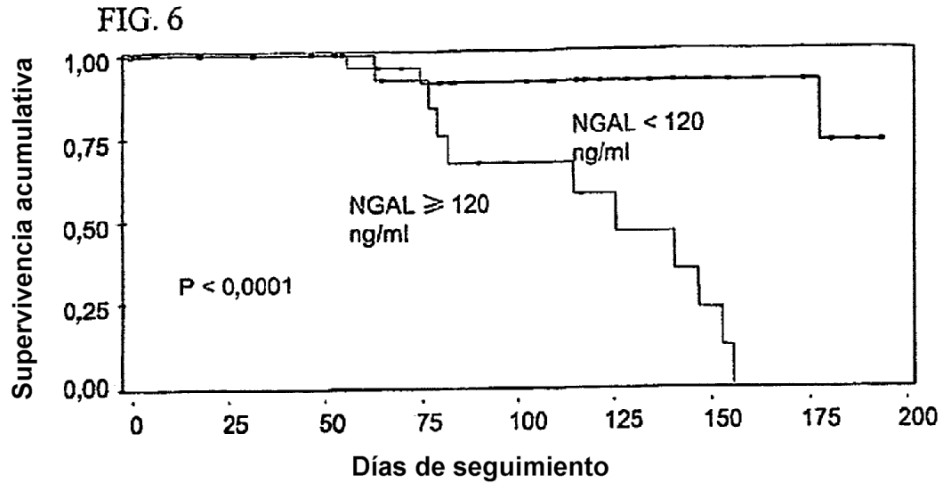


FIG. 8

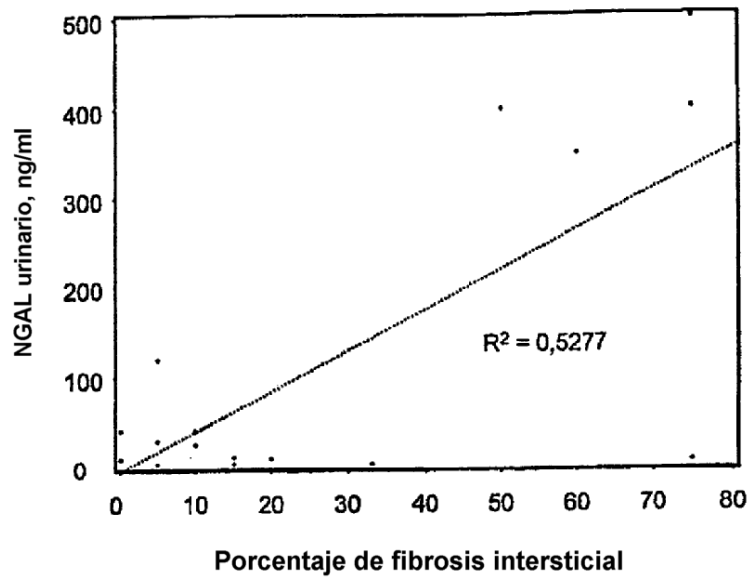


FIG. 9

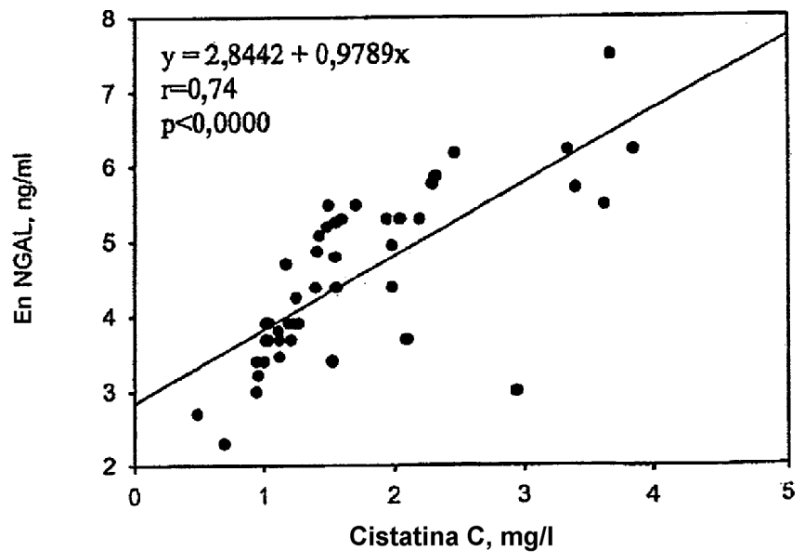


FIG. 10A

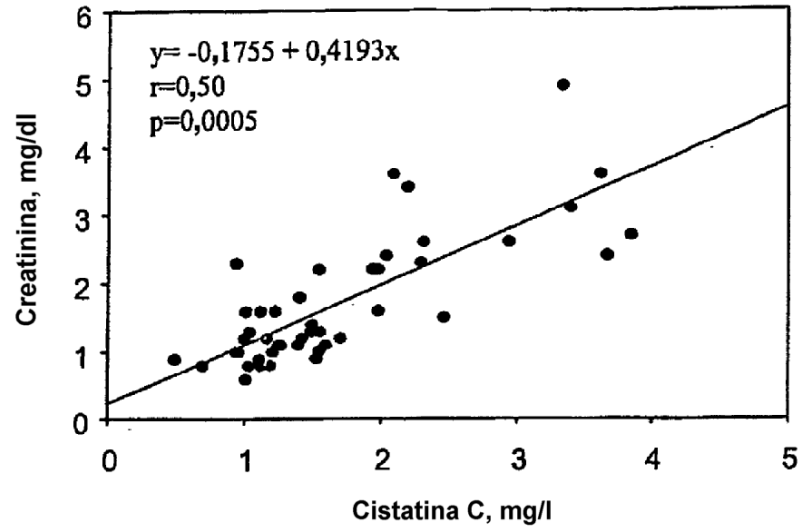


FIG. 10B

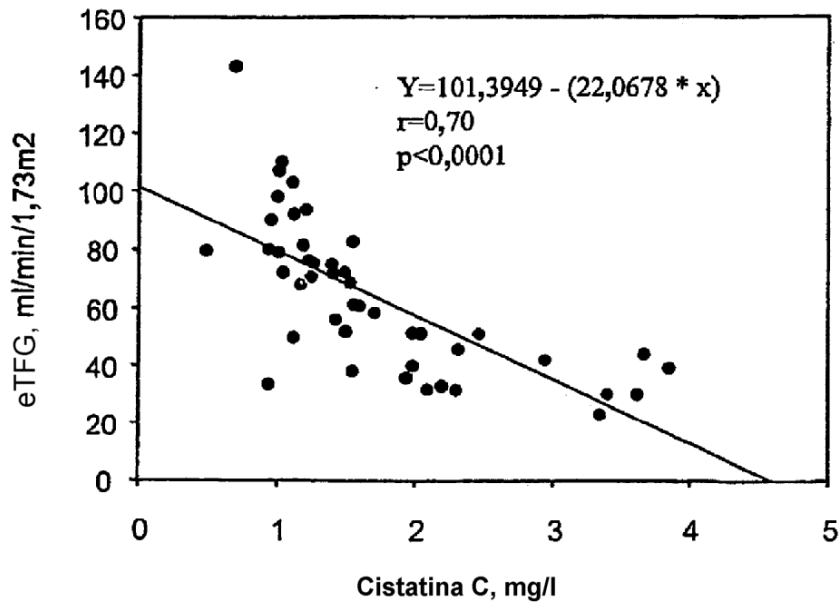


FIG. 10C

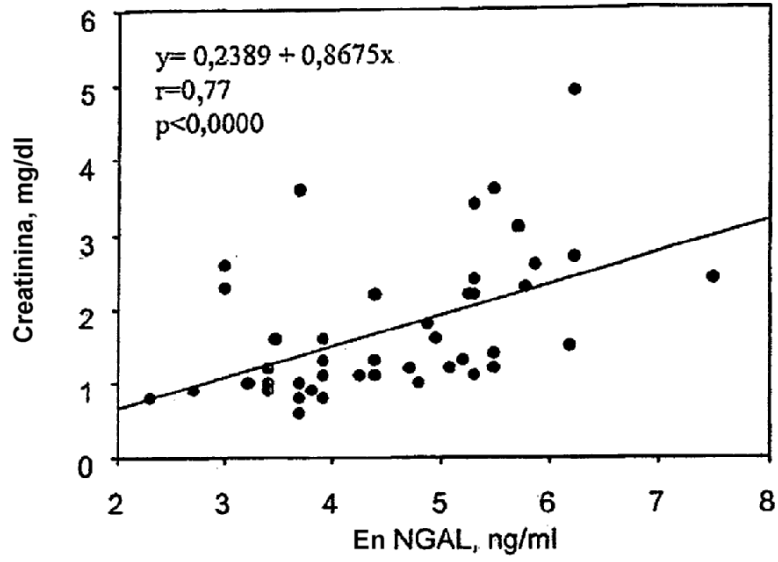


FIG. 10D

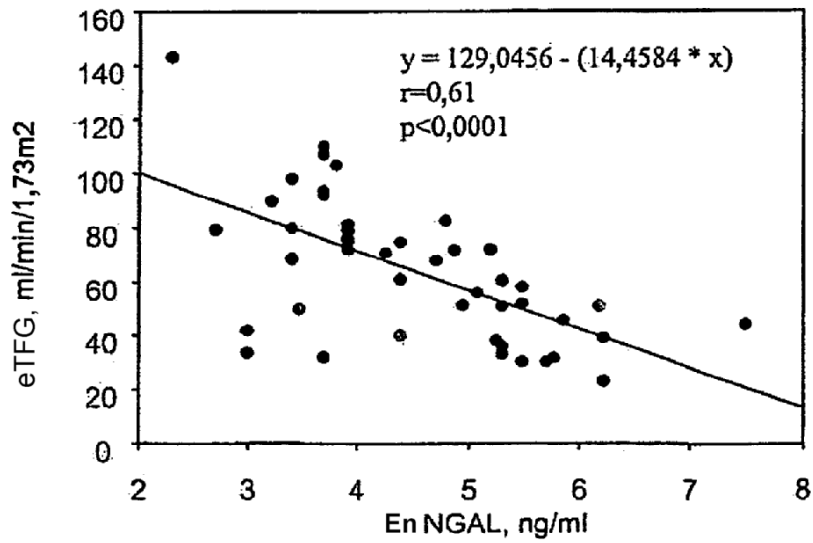


FIG. 11A

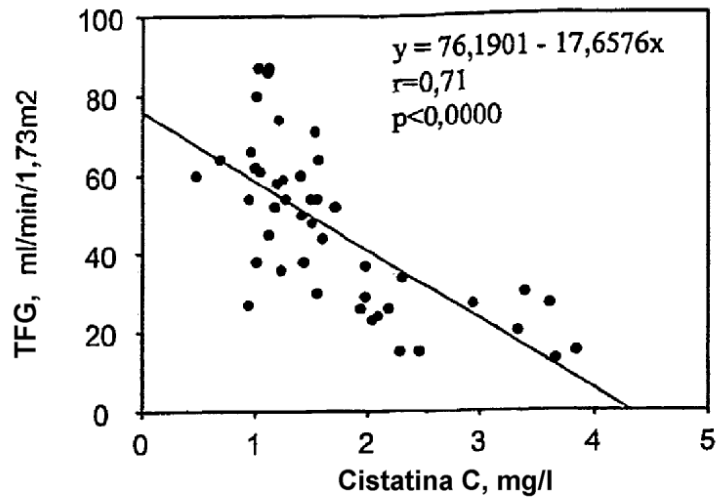


FIG. 11B

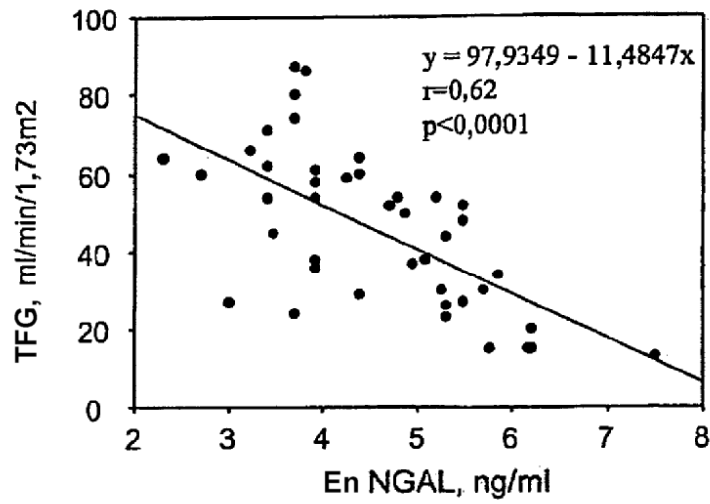


FIG. 11C

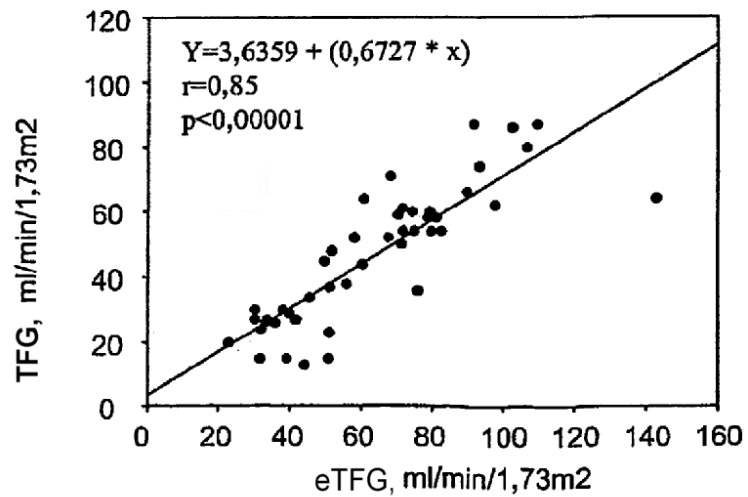


FIG. 12A

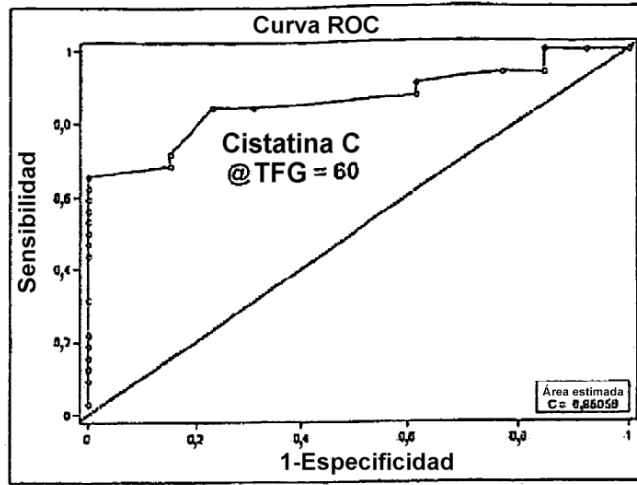


FIG. 12B

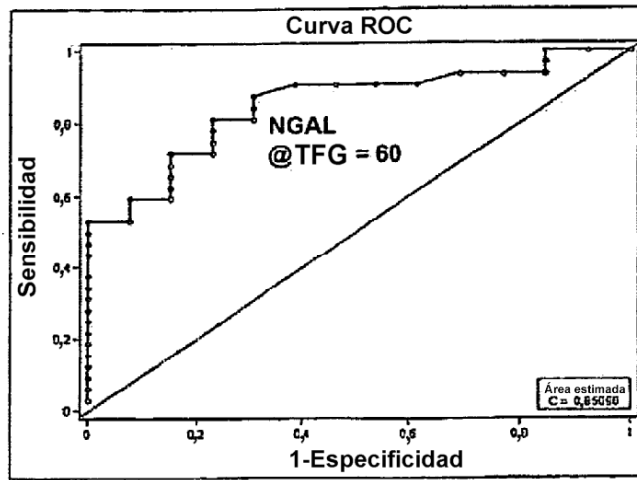


FIG. 12C

