

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 361**

51 Int. Cl.:

C07K 14/81 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
C07K 14/57 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/70 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
G01N 33/92 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2013 PCT/GB2013/052148**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014 WO14027188**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2013 E 13750917 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2883061**

54 Título: **Biomarcadores de enfermedad renal**

30 Prioridad:

13.08.2012 GB 201214440

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2017

73 Titular/es:

RANDOX LABORATORIES LTD. (100.0%)
Ardmore 55 Diamond Road Crumlin Co Antrim
Northern Ireland
BT29 4QY, GB

72 Inventor/es:

MCCONNELL, IVAN;
FITZGERALD, STEPHEN PETER;
LAMONT, JOHN y
RICHARDSON, CIARAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 622 361 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores de enfermedad renal

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la enfermedad renal y a los métodos para su diagnosis.

5 Antecedentes de la invención

Enfermedad renal es un término general, que describe una clase de afecciones en las que los riñones fallan en su función de filtrar y eliminar productos residuales de la sangre. Existen dos formas de enfermedad renal; la insuficiencia renal aguda (IRA) y la enfermedad renal crónica (ERC). La ERC normalmente es asintomática, excepto en su estado más avanzado. En consecuencia, normalmente se requieren análisis sanguíneos y/o de orina para realizar la diagnosis.

La definición de ERC desarrollada por la “*Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*” (KDOQI) es:

1. Daño renal presente durante al menos 3 meses, definido por anormalidades estructurales o funcionales (la mayoría de las veces basadas en una albuminuria incrementada, p.ej., una relación albúmina urinaria / creatinina [UACR] ≥ 30 mg/g), y/o
- 15 2. Una tasa de filtración glomerular (GFR) <60 mL/min/1,73 m² presente durante al menos 3 meses.

En este contexto, la KDOQI clasifica la ERC en cinco estadios o etapas, según se indica a continuación:

- Estadio 1: Daño renal con GFR ≥ 90 mL/min/1,73 m².
- Estadio 2: Daño renal con GFR 60-89 mL/min/1,73 m².
- Estadio 3: GFR 30-59 mL/min/1,73 m².
- 20 • Estadio 4: GFR 15-29 mL/min/1,73 m².
- Estadio 5: GFR < 15 mL/min/1,73 m² o fallo renal tratado mediante diálisis o trasplante.

En los Estados Unidos, en base a datos del estudio “*1999-2006 National Health and Nutrition Examination Survey*” (NHANES), se estima que un 11,1 por ciento de los adultos con edad de 20 años o más (22,4 millones) presentan ERC de los estadios 1-3. Otros 0,8 millones de adultos de los EE.UU. con edad de 20 años o más presentan ERC de estadio 4, y más de 0,3 millones presentan ERC de estadio 5 y reciben hemodiálisis.

El análisis de los datos NHANES entre 1988-1994 y 1999-2004 sugiere que la prevalencia de la ERC está aumentando en todos los estadios de la ERC, pero con un aumento particular en la prevalencia de individuos clasificados con ERC de estadio 3. También ha aumentado el número de pacientes con ERC de estadio 5 que requieren diálisis. Se ha estimado que para 2015 más de 700.000 individuos padecerán Enfermedad Renal Terminal (ERT).

Aunque la ERC puede estar producida por enfermedades renales primarias (p.ej., enfermedades glomerulares, enfermedades tubulointersticiales, obstrucción, y enfermedad renal poliquística), en la gran mayoría de los pacientes con ERC, el daño renal está asociado a otras afecciones médicas tales como la diabetes y la hipertensión. En 2008, excluyendo a los pacientes con ERT, el 48 por ciento de los pacientes Medicare con ERC presentaban diabetes, el 91 por ciento tenían hipertensión, y el 46 por ciento presentaban enfermedad cardíaca aterosclerótica. Otros factores de riesgo para la ERC incluyen la edad, la obesidad, el historial familiar y la etnia.

La ERC ha sido asociada a numerosos resultados sanitarios adversos. Muchos estudios han publicado que una GFR de 30-59 mL/min/1,73 m² está asociada a un aumento del riesgo de mortalidad, enfermedad cardiovascular, fracturas, pérdida ósea, infecciones, deficiencia cognitiva y debilidad. De forma similar, parece que existe una relación graduada entre la gravedad de la proteinuria y la albuminuria y los resultados sanitarios adversos, que incluyen mortalidad, ERT, y enfermedad cardiovascular. Además, el riesgo de resultados adversos conferido por una GFR reducida y por un aumento de la albuminuria (o de la proteinuria) parece ser independiente y multiplicativo.

Las razones para considerar el escrutinio de la ERC en estadios tempranos incluyen la elevada y creciente prevalencia de la ERC, sus factores de riesgo conocidos, sus numerosas consecuencias adversas sobre la salud, su larga fase asintomática, la disponibilidad de ensayos de escrutinio potenciales para la ERC, y la disponibilidad de tratamientos que pueden alterar el curso de la ERC en estadios tempranos y reducir complicaciones de la ERC en estadios tempranos o sus afecciones sanitarias asociadas.

Algunas organizaciones recomiendan ya el escrutinio de la ERC en poblaciones seleccionadas. El documento “*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*” (KDIGO) recomienda el escrutinio de todos los pacientes con hipertensión, diabetes o enfermedad cardiovascular. La “*American Diabetes Association*” recomienda un escrutinio anual de todos los adultos con diabetes, en base a “el consenso de expertos o la experiencia clínica”. El “*Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*” (JNC7) recomienda el escrutinio anual de todos los pacientes con hipertensión y diabetes combinadas. También en defensa

de un escrutinio seleccionado, la “*National Kidney Foundation*” patrocina escrutinios de ERC gratuitos para todos los adultos con hipertensión, diabetes o con un pariente directo con un historial de enfermedad renal, hipertensión o diabetes.

5 En la mayoría de los pacientes con ERC en estadios 1-3 la GFR disminuye lentamente. Sin embargo, la tasa de reducción varía de un individuo a otro, y aparentemente multitud de factores influyen en dicha progresión. Puesto que la ERC en estadios 1-3 normalmente progresa asintóticamente, la detección de la ERC en estadios tempranos requiere ensayos de laboratorio.

10 Algunas organizaciones recomiendan la monitorización de los cambios en la función renal o en el daño renal en pacientes con ERC. Por ejemplo, la “*Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*” (KDOQI) recomienda al menos una medida anual de la GFR estimada en adultos con ERC a fin de predecir la aparición de la ERT y evaluar el efecto de los tratamientos de ERC. La JNC7 recomienda una determinación anual cuantitativa de albuminuria en todos los pacientes con “enfermedad renal”. La KDOQI también recomienda una monitorización más frecuente de pacientes de ERC con una función renal en deterioro.

15 La aparición en sangre de proteínas celulares liberadas tras una lesión tisular está adquiriendo un interés cada vez mayor, ya que es importante para el tratamiento de pacientes con lesiones en tejidos debidas a una isquemia/reperfusión aguda, trastornos neurológicos, cáncer, rechazo de órganos o trauma. La proteína de unión ácido graso (FABP) es uno de dichos biomarcadores de lesión tisular. Se trata de una proteína citoplasmática relativamente pequeña (15 kDa), que es expresada de manera abundante en tejidos con un metabolismo de ácidos grasos activo, p.ej., en corazón e hígado. Hasta el momento se han identificado nueve tipos distintos de FABP, y todos los tipos exhiben una estructura característica de distribución en tejidos. Son denominadas en función del tejido en el que fueron descubiertas por primera vez e incluyen el tipo hepático (L-FABP/FABP1), el tipo intestinal (I-FABP/FABP2), el tipo muscular y cardíaco (H-FABP/FABP3), el tipo adipocito (A-FABP/FABP4), el tipo epidérmico (E-FABP/FABP5), el tipo ileal (I-FABP/FABP6), tipo cerebral (B-FABP/FABP7), tipo mielina (M-FABP/FABP8) y tipo testicular (T-FABP/FABP9).

25 Las FABPs se unen a ácidos grasos (AG) de cadena larga con una elevada afinidad. Su estructura terciaria incorpora un barril beta ligeramente elíptico ligado a una estructura de hélice-giro-hélice, que se cree que actúa como portal para el acceso y el egreso de los AG. Su función primaria es la de facilitar el transporte intracelular de ácidos grasos de cadena larga, aunque otras funciones incluyen la regulación de la expresión génica a través de la mediación en la traslocalización de señal de ácido graso a receptores activados de proliferador de peroxisoma (PPARs).

30 La FABP1 es expresada en los túbulos proximales del riñón, el hígado, el intestino, el páncreas, el pulmón y el estómago. Se ha propuesto la hipótesis de que está implicada en la absorción de lípidos por parte de enterocitos y en el transporte de lípidos de hepatocitos y en el metabolismo de lipoproteínas. Sus características superficiales y de unión únicas probablemente contribuyen a sus propiedades funcionales específicas. Al contrario que la unión estequiométrica de AG de cadena larga de otras FABPs, cada molécula de FABP1 se une a dos moléculas de AG. También se une a una variedad de otros ligandos hidrofóbicos pequeños, tales como lisofosfolípidos, heme y vitamina K.

35 La patente de EE.UU. nº 7.592.148 B1 describe un método para la diagnosis o prognosis de enfermedad renal en humanos, que comprende la detección de FABP1 en tejido renal o en la orina. Kamijo *et al.* (Diabetes Care 2011; 34: 691-6) emplearon el CMIC ELISA para demostrar que la excreción urinaria de FABP1 aumenta con el deterioro de la función renal, mientras que el nivel de FABP1 en suero no se vio afectado de forma significativa. Estos métodos incluyen la determinación de FABP1 en orina como matriz de muestra. El CMIC ELISA se encuentra disponible comercialmente para el análisis de FABP1 en orina. La patente de EE.UU. nº 7.592.148 B1 presenta el análisis de 45 NAG (N-acetil-β-D-glucosaminidasa) en los especímenes de orina. La NAG es una enzima marcador que existe en las células de tejido renal, y el nivel de NAG en la orina generalmente es considerado un indicador de lesión del tejido renal. Se confirmó que el nivel de NAG y el de FABP1 se correlacionan positivamente uno con el otro en los casos estándares. Sin embargo, en un 15% de los casos, aunque el nivel de NAG fue elevado, el nivel de FABP fue bajo. Se sugirió que, en este grupo, el nivel de FABP1 en los tejidos de riñón es bajo. Sin embargo, también podría postularse que el bajo nivel de FABP1 en dichas muestras puede deberse a la naturaleza de la enfermedad en estos 50 pacientes concretos, que da como resultado una reducción de la cantidad de FABP1 liberada a la orina.

55 Existe bibliografía científica que sugiere que los descubrimientos de la publicación de Kamijo *et al* no han sido consistentes con el trabajo realizado por otros grupos. Kim SS *et al.* (Diab Res Clin Pract, 2012) descubrieron que el nivel de FABP1 no es significativamente elevado en la orina de pacientes con microalbuminuria. Además, descubrieron que muchas de las muestras de orina se encontraban por debajo del rango de detección del CMIC ELISA usado en el estudio. Kamijo *et al* (2006) indican que el uso del nivel de FABP1 en suero no es un biomarcador efectivo para la enfermedad renal, ya que la fuente de la FABP1 también puede proceder de daños en el tejido hepático. Naturalmente, esto llevaría a otros a ignorar la utilidad de medir los niveles en suero de la FABP1 como ayuda en la diagnosis de la enfermedad renal.

Por otro lado, los documentos Kamijo *et al.* (J lab Clin Med 2004; 143(1): 23-30) y Kamijo-Ikemori *et al.* (Clinica Chimica Acta 2006; 374(1-2): 1-7) muestran el uso de un dispositivo de estado sólido que comprende un sustrato que tiene inmovilizado sobre él un anticuerpo de α -FABP1 para detectar niveles de FABP1 en muestras de orina.

5 Adicionalmente, se han propuesto varios métodos diagnósticos alternativos para la detección y estratificación de pacientes con ERC. El documento WO 2011/162819 describe un método para determinar si el paciente presenta disfunción renal midiendo los niveles de varios biomarcadores, que incluyen FABP1, cistatina C, creatinina y γ -GT, usando una serie de ensayos. El documento WO 2009/114699 describe un método para estratificar pacientes con ERC en base a la medición de una versión de alto peso molecular de lipocalina asociada a neutrófilo gelatinasa. El documento WO 2010/048346 describe la detección de niveles de AST en combinación con otros biomarcadores para determinar si un paciente presenta disfunción renal.

10 A pesar de la importancia de medir parámetros clínicos para la ERC en suero o en orina, existen pocos ensayos diagnósticos para predecir y monitorizar la progresión de dicha enfermedad. La medición de la GFR no es suficientemente sensible para una detección temprana de la enfermedad renal, mientras que la medición de la proteína urinaria no es específica de la enfermedad renal, ni es adecuada para monitorizar la progresión de la enfermedad. Por tanto, existe una necesidad de un marcador clínico específico y sensible para la diagnosis de la ERC temprana y para la clasificación de la enfermedad renal.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos para la diagnosis de la disfunción renal. Más específicamente, la invención proporciona un análisis sanguíneo simple con una elevada sensibilidad y especificidad para FABP1, que proporciona los medios para alcanzar un diagnóstico temprano y una clasificación de la ERC.

La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente realizado por los inventores de que se observa una regulación al alza progresiva del nivel de FABP1 en suero en pacientes con ERC de estadio 1, 2 y 3, en comparación con el nivel en suero de individuos de control.

25 En un primer aspecto, un método para clasificar un paciente que padece ERC en uno de los estadios 1-3 de la ERC, que comprende la determinación del nivel de los biomarcadores FABP1, γ -GT, AST, creatinina y cistatina C en una muestra de suero obtenida del paciente. El nivel de FABP1 en la muestra se puede comparar con un valor de control y los niveles de γ -GT, AST, creatinina y cistatina C en la muestra se pueden comparar con un rango de valores de control para cada biomarcador, en donde un aumento del nivel de FABP1 con respecto al valor de control y niveles de γ -GT, AST, creatinina y cistatina C dentro del rango de los valores de control de cada biomarcador indican que el paciente padece ERC en estadio 1, o en donde un aumento del nivel de FABP1 con respecto al valor de control, niveles γ -GT y AST dentro del rango de valores de control de ambos biomarcadores, y un aumento de los niveles de creatinina y de cistatina C con respecto a un valor umbral superior del rango de control para dichos biomarcadores indican que el paciente padece ERC en estadio 2 o estadio 3.

35 En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para determinar si un paciente padece, o en está en riesgo de desarrollar, una disfunción renal, que comprende la determinación del nivel de FABP1 en una muestra de suero aislada del paciente poniendo en contacto la muestra con un dispositivo de estado sólido que comprende un sustrato que tiene una superficie activada sobre el mismo, al que se ha aplicado un anticuerpo de FABP1 en áreas discretas de la superficie activada, y comparar el nivel de FABP1 de la muestra con un valor de control de FABP1, en donde un aumento del nivel de FABP1 con respecto al valor de control indica que el paciente tiene, o está en riesgo de desarrollar, una disfunción renal.

45 En un tercer aspecto la invención es un método para determinar la eficacia de un tratamiento con fármacos para ERC, que comprende clasificar a un paciente que padece ERC en uno de los estadios 1-3 de la ERC según el método del primer aspecto de la presente invención antes y después del tratamiento, en donde una reducción del estadio de ERC, un retardo o una parada de la progresión a un estadio más avanzado de la ERC tras el tratamiento indica que el tratamiento ha tenido éxito.

Descripción de las Figuras

La invención se describe en referencia a las siguientes Tablas y Figuras, en las que:

Figura 1: muestra la linealidad de un ensayo de FABP1.

Figura 2: muestra los niveles de FABP1 en suero de pacientes con enfermedad renal.

50 Figura 3: muestra los niveles de cistatina C en suero de pacientes con enfermedad renal.

Tabla 5 y Figura 4: muestran los niveles de creatinina en suero de pacientes con enfermedad renal.

Figura 5: muestra los niveles de AST en suero de pacientes con enfermedad renal.

Figura 6: muestra el nivel de γ -GT en suero de pacientes con enfermedad renal.

Figura 7: muestra los niveles de FABP1 en suero tomado de pacientes metabólicos en comparación con los controles.

Figura 8: muestra los niveles de cistatina C en suero tomado de pacientes con síndrome metabólico en comparación con los controles.

5 Figura 9: muestra los niveles de creatinina en suero tomado de pacientes con síndrome metabólico en comparación con los controles.

Figura 10: muestra el nivel de AST en muestras de suero de pacientes con síndrome metabólico y en controles.

Figura 11: muestra el nivel de γ -GT en muestras de suero de pacientes con síndrome metabólico y en controles.

10 Figura 12: muestra un análisis de curva receptor-operador (CRO) para determinar la especificidad y la sensibilidad de la invención para discriminar entre los grupos de control y todos los pacientes con ERC.

Figura 13: muestra un análisis de curva receptor-operador (CRO) para determinar la especificidad y la sensibilidad de la invención para discriminar entre pacientes de ERC en estadio 1 y todos los demás, que incluyen los grupos de control y los pacientes de ERC en estadio 2 y estadio 3.

15 Figura 14: muestra un análisis de curva receptor-operador (CRO) para determinar la especificidad y la sensibilidad de la invención para discriminar entre pacientes de ERC en estadio 2 y todos los demás, que incluyen los grupos de control y los pacientes de ERC en estadio 1 y estadio 3.

Figura 15: muestra un análisis de curva receptor-operador (CRO) para determinar la especificidad y la sensibilidad de la invención para discriminar entre pacientes de ERC en estadio 3 y todos los demás, que incluyen los grupos de control y los pacientes de ERC en estadio 1 y estadio 2.

20 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona un método para la detección de disfunción renal mediante la determinación del nivel de FABP1 en una muestra de suero obtenida de un paciente, y comparando el nivel de FABP1 con un control. Un aumento del nivel de FABP1 en la muestra con respecto al control indica que el paciente padece, o está en riesgo de desarrollar, una disfunción renal.

25 El término “disfunción renal” en el contexto de la presente invención se entiende que significa afecciones o enfermedades que se caracterizan por una reducción de la función renal en relación a pacientes sanos. Las enfermedades renales pueden incluir enfermedad renal crónica (ERC), insuficiencia renal aguda (IRA), nefropatía diabética, glomerulonefritis, glomerulosclerosis focal, nefropatía compleja inmune o lupus nefritis. La disfunción renal puede estar causada por una lesión renal inducida por fármacos, o por un rechazo de injerto de riñón. La disfunción renal se puede caracterizar como síndrome nefrótico o insuficiencia renal.

30 En el contexto de la presente invención, un “valor de control” se entiende como el nivel de un biomarcador particular, tal como FABP1, γ -GT, AST, creatinina o cistatina C, encontrado habitualmente en individuos sanos. El nivel de control de un biomarcador puede determinarse mediante análisis de una muestra aislada de un individuo sano o puede ser el nivel del biomarcador que el especialista en la técnica juzgue como habitual para un individuo sano. El “valor de control” puede ser un rango de valores considerado por el especialista como un nivel normal para el biomarcador en un individuo sano. El especialista apreciará que los valores de control pueden ser calculados por el usuario analizando el nivel del biomarcador en una muestra procedente de un individuo sano, o en referencia a los valores típicos proporcionados por el fabricante del ensayo usado para determinar el nivel de biomarcador en la muestra.

35 La muestra obtenida a partir del paciente es una muestra de suero. La determinación del nivel de FABP1 puede realizarse en una o más muestras de suero del paciente. La muestra de suero se puede obtener del paciente empleando los métodos usados de forma rutinaria en la técnica.

40 Los presentes inventores han descubierto que existe un aumento progresivo del nivel de FABP1 en muestras obtenidas de pacientes que padecen ERC que se correlaciona con el estadio de progresión de la enfermedad. De esta manera, la presente invención puede usarse para diagnosticar la ERC en estadios tempranos. En el contexto de la presente invención, “estadio temprano” pretende indicar cualquiera de los tres primeros estadios de la ERC, tal como se definen en la clasificación KDOQI.

45 La presente invención también proporciona un método para clasificar pacientes en uno de los estadios 1-3 de ERC según el nivel de los biomarcadores FABP1, γ -GT, AST, creatinina y cistatina C en una muestra de suero obtenida del paciente. Los niveles medidos de cada biomarcador pueden compararse con los rangos de control de cada biomarcador, que tienen cada un nivel umbral superior y uno inferior. Los rangos de control de los valores de biomarcadores pueden variar dependiendo de la demografía de la población. Los umbrales superior e inferior para una demografía de muestra y paciente dada pueden ser determinados por el especialista en la técnica a través del análisis de muestras de una cohorte de pacientes para obtener valores promedio. Un ejemplo de este tipo de

método se describe en el Ejemplo 7. Preferiblemente, un nivel de FABP1 en suero de aproximadamente 15 ng/mL a 75 ng/mL para mujeres, y de aproximadamente 21 ng/mL a 151 ng/mL para hombres, indica una ERC de estadio 1 o de estadio 2. Una concentración de FABP1 por encima de aproximadamente 75 ng/mL en mujeres, o de 151 ng/mL en hombres, indica una ERC de estadio 3 o superior. El aumento progresivo de los niveles de FABP1 en suero

5

significa que es posible determinar la tasa de progresión de la enfermedad renal en un paciente. La estratificación de pacientes en una de los estadios de la ERC es útil para determinar si un paciente se beneficiaría de un tipo de tratamiento, en comparación con otro, y también para monitorizar si un tratamiento es útil. La clasificación de pacientes también ayuda a determinar la prognosis del paciente, facilitando de este modo los requerimientos de cuidados futuros.

La GFR estimada se correlaciona inversamente con los niveles de creatinina y/o cistatina C. Un aumento de los niveles de creatinina o de cistatina C con respecto a un valor de control en pacientes que presenten niveles elevados de FABP1 permite clasificar a los pacientes en ERC de estadio 1 o de estadio 2. De esta manera, el primer aspecto de la invención comprende además la determinación del nivel de creatinina y cistatina C en comparación con el nivel de los rangos normales de dichos biomarcadores (Tabla 13). Los pacientes que presentan niveles incrementados de FABP1 en comparación con un valor de control (tal como se demuestra en el Ejemplo 7), pero niveles de creatinina y cistatina C dentro de los rangos de control para dichos biomarcadores, pueden clasificarse como ERC en estadio 1. Los pacientes que presentan niveles incrementados de FABP1 en comparación con un valor de control y niveles de creatinina y/o cistatina C comparados con un rango de valores de control para cada biomarcador pueden clasificarse como ERC de estadio 2. Un nivel incrementado de FABP1 por encima de un rango de control y niveles incrementados de creatinina y/o cistatina C en comparación con un rango de valores de control para cada biomarcador indica que el paciente padece ERC en estadio 3 o superior. Los niveles de γ -GT, AST, creatinina y cistatina C se pueden determinar mediante métodos cuantitativos usados rutinariamente conocidos en la técnica. De este modo, los métodos de la presente invención permiten la clasificación de un paciente que presente disfunción renal como paciente que no tiene ERC o como paciente en uno de los estadios 1 a 3 de la ERC. Preferiblemente, la clasificación del paciente puede seguir los siguientes criterios:

15

20

25

“No ERC” – nivel de FABP1 por debajo del umbral inferior calculado por el especialista en la técnica a partir de una cohorte de individuos sanos. Preferiblemente, dicho umbral inferior es 15 ng/mL (mujeres) y 21 ng/mL (hombres);

30

“Estadio 1” – nivel de FABP1 por encima del umbral inferior definido antes y nivel de creatinina y cistatina C dentro del rango de control para dichos biomarcadores, y nivel de AST o γ -GT dentro del rango de control para dichos biomarcadores;

“Estadio 2” – FABP1 por encima del umbral inferior definido antes y nivel de creatinina y/o cistatina C por encima del rango de control para dichos biomarcadores;

35

“Estadio 3” – FABP1 por encima del umbral superior definido antes y nivel de creatinina y/o cistatina C superior al rango de control para dichos biomarcadores. Preferiblemente el umbral superior para FABP1 es >75 ng/mL (Mujeres) y >151 ng/mL (Hombres).

Los niveles de rango de control y de umbral superior para los biomarcadores cistatina C, creatinina, AST y γ -GT se presentan en las Tablas 4-6, respectivamente.

40

Los métodos de la presente invención pueden usar los métodos para determinar el nivel de FABP1, γ -GT, AST, cistatina C y creatinina conocidos en la técnica, tales como los métodos basados en la determinación enzimática y/o química de proteínas y en ensayos inmunológicos. Los ensayos inmunológicos para determinar el nivel de FABP1, γ -GT, AST, cistatina C y creatinina pueden llevarse a cabo en una variedad de formatos de ensayo, que incluyen ensayos tipo sándwich (p.ej., ELISA), ensayos competitivos (RIA competitivo), inmunoensayos puente, inmunohistoquímica (IHC) e inmunocitoquímica (ICC). Los métodos para determinar el nivel de FABP1, γ -GT, AST, cistatina C y creatinina incluyen poner en contacto una muestra de paciente con anticuerpos que se unan a FABP1, γ -GT, AST, cistatina C y creatinina, y detectar la unión. Los anticuerpos que presentan especificidad por FABP1, γ -GT, AST, cistatina C y creatinina pueden inmovilizarse sobre un material soporte empleando métodos convencionales. La unión de FABP1, γ -GT, AST, cistatina C y creatinina a los anticuerpos del soporte se puede detectar usando otros anticuerpos que presenten especificidad por FABP1, γ -GT, AST, cistatina C y creatinina, o usando métodos físicos tales como la resonancia de plasmón superficial (Biacore Int., Suecia).

45

50

En determinados aspectos se usa un dispositivo de estado sólido para determinar el nivel de FABP1 en la muestra de suero aislada del paciente. El dispositivo de estado sólido comprende un sustrato que tiene una superficie activada sobre la que se aplica un anticuerpo de FABP1 para discriminar áreas de la superficie activada. Preferiblemente, el dispositivo de estado sólido puede llevar a cabo ensayos multi-análisis de tal modo que se puede determinar el nivel de FABP1 en una muestra aislada del paciente simultáneamente con el nivel en la muestra de uno cualquiera de aspartato transaminasa (AST) y gamma glutamil transpeptidasa (γ -GT), cistatina C y creatinina. En esta realización, el dispositivo de estado sólido presenta una multiplicidad de sitios de reacción discretos, que portan cada uno un anticuerpo deseado ligado covalentemente al sustrato, y en el que la superficie del sustrato entre

55

los sitios de reacción es inerte con respecto al biomarcador diana. El dispositivo de estado sólido multi-analito usado en la presente invención puede presentar, por tanto, poca o ninguna unión no específica.

5 Un dispositivo que puede usarse en la invención se puede preparar activando la superficie de un sustrato adecuado, y aplicando un conjunto de anticuerpos sobre sitios discretos de la superficie. Si se desea, las otras áreas activas pueden bloquearse. Los ligandos pueden unirse al sustrato a través de un elemento de enlace. En particular, se prefiere que la superficie activada reaccione sucesivamente con un organosilano, un ligando bifuncional y el anticuerpo. El dispositivo de estado sólido usado en los métodos de la presente invención puede fabricarse según el método descrito, por ejemplo, en la patente GB-A-2324866.

10 Preferiblemente el dispositivo de estado sólido usado en los métodos de la presente invención es el sistema "Biochip Array Technology" (BAT) (disponible en Randox Laboratories Limited).

El dispositivo de estado sólido usado en el método de la presente invención comprende un anticuerpo de FABP1. Preferiblemente el anticuerpo es específico de FABP1 y exhibe una reactividad cruzada inferior al 0,5%, preferiblemente inferior al 0,1%, con otros subtipos de FABP y con mioglobina. Preferiblemente, el anticuerpo de FABP1 es un anticuerpo monoclonal.

15 También se ha demostrado que el nivel de FABP1 en suero está producido por la enfermedad hepática. A fin de discriminar entre un aumento de los niveles de FABP1 producido por enfermedad renal y por enfermedad hepática, la presente invención puede comprender además la determinación de uno o más biomarcadores de enfermedad hepática y la comparación del nivel de dichos biomarcadores con controles. Los biomarcadores de enfermedad hepática pueden incluir AST y γ -GT. Por tanto, se puede validar que un aumento observado del nivel de FABP1 en la muestra se debe a que el paciente presenta enfermedad renal confirmando que otros marcadores de daño hepático, tales como AST o γ -GT, se encuentran en los rangos normales para asegurar la precisión del ensayo. De esta manera, en el caso de discriminar entre niveles incrementados de FABP1 producidos por enfermedad hepática o por enfermedad del riñón, y para clasificar a los pacientes entre ERC de estadio 1 y ERC de estadio 2, el dispositivo de estado sólido usado en el método de la presente invención puede comprender además anticuerpos específicos de AST, γ -GT, cistatina C y creatinina.

20 Los métodos de la presente invención pueden usarse para monitorizar un paciente post-operación para determinar el riesgo de que desarrolle complicaciones renales. Específicamente, se puede obtener una muestra de un paciente a intervalos dados post-operación y determinar el nivel de FABP1 en la muestra. Una determinación del nivel de FABP1 a lo largo de un margen de tiempo particular proporciona al médico una indicación de si el paciente padece ERC en estadio temprano y si se puede llevar a cabo la consiguiente intervención médica.

35 Se acepta que los pacientes con síndrome metabólico presentan un riesgo incrementado de desarrollar ERC. Por lo tanto, un ensayo que pueda identificar y clasificar dichos pacientes en los diversos estadios de la ERC conllevaría beneficios clínicos significativos en la determinación de la probabilidad de éxito de un tratamiento dado aplicado al paciente, o para proporcionar una guía pronóstica para futuros protocolos de tratamiento. Los criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico según la *Federación Internacional de Diabetes* son los siguientes:

Obesidad central (definida como circunferencia de cintura* con valores específicos de etnia) más dos cualesquiera de los siguientes cuatro factores:	
Nivel elevado de triglicéridos	≥ 150 mg/dL (1,7 mmol/L) o tratamiento específico para esta anomalía de lípidos
Nivel reducido de colesterol HDL	< 40 mg/dL (1,03 mmol/L) en hombres < 50 mg/dL (1,29 mmol/L) en mujeres o tratamiento específico para esta anomalía de lípidos
Tensión sanguínea elevada	Tensión arterial sistólica ≥ 130 o Tensión arterial diastólica ≥ 85 mmHg o tratamiento específico de hipertensión diagnosticada previamente
Nivel elevado de glucosa en plasma en ayunas	(FPG) ≥ 100 mg/dL (5,6 mmol/L) o diabetes de tipo 2 diagnosticada previamente Si está por encima de 5,6 mmol/L o 100 mg/dL, se recomienda encarecidamente OGTT pero no es necesario definir la presencia del síndrome

*Si el IMC es > 30 kg/m², se puede asumir obesidad central y no es necesario medir la circunferencia de la cintura.

40 Los inventores han descubierto que el análisis de FABP1 en suero de los pacientes de síndrome metabólico muestra un aumento estadísticamente significativo en la concentración de FABP1 en comparación con muestras de donantes sanos. El método de la presente invención es, por lo tanto, particularmente adecuado para pacientes que presentan síndrome metabólico como medio para clasificar a dichos pacientes en los diversos estadios de la ERC. De forma más preferible, el paciente que padece síndrome metabólico puede ser diagnosticado por el método de la invención

durante los estadios tempranos de la ERC (que incluyen los estadios 1 ó 2) y pueden tratarse clínicamente y ser monitorizados para reducir el riesgo de desarrollar enfermedad renal. Igualmente, los pacientes con síndrome metabólico con una GFR comprometida pueden ser clasificados adicionalmente usando el método de la presente invención para identificar a los pacientes con un mayor riesgo de desarrollar enfermedad renal.

5 Los pacientes que padecen síndrome metabólico pueden presentar niveles altos de FABP1 debido a una enfermedad hepática subyacente. Por lo tanto, cuando el paciente padece síndrome metabólico, el método de la invención puede comprender además la etapa de determinar el nivel de los biomarcadores correspondientes a la enfermedad hepática en una muestra obtenida del paciente, tales como AST o γ -GT, y comparar el nivel de dichos marcadores con un control para validar que el aumento de FABP1 se debe a enfermedad renal.

10 La invención se describe adicionalmente en referencia a los siguientes ejemplos no limitativos:

Ejemplo 1: Expresión de FABP1 humana recombinante

Expresión de antígeno de FABP-1 humana en células de *E. coli* (BL21)

15 La construcción de expresión de FABP-1, bajo el control de un promotor T7 fue transformada en células BL21 de la cepa K12 de *E. coli*. Las células transformadas fueron crecidas durante una noche en placas de agar LB que contenían 100 μ g/mL de ampicilina. Se creció un cultivo de una noche a partir de una placa recién obtenida y se usó para inocular 100 mL de caldo LB. El cultivo se incubó a 37°C hasta que la densidad celular alcanzó una DO₆₀₀ entre 0,4 – 0,8 UA. Se indujo la expresión por ARN polimerasa T7 mediante la adición de IPTG 1 mM y las células fueron incubadas durante 2 horas a 37°C con agitación.

Purificación de antígeno de FABP-1 humana

20 Las células fueron recolectadas mediante centrifugación (15 minutos; 5000 rpm; 4°C) y las partículas se lavaron en 1 x PBS pH 7,2. Las partículas fueron congeladas instantáneamente en nitrógeno líquido. La partícula de células fue lisada en CellLytic B (Sigma) que contenía PMSF 2 mM (Sigma) y 10 μ g/mL de ADNsa I (Sigma) durante 1 hora a 4°C con mezcla. A continuación se clarificó el sobrenadante mediante centrifugación (15 minutos; 5000 rpm; 4°C).
25 Se preparó una columna calibrada de sefarosa-cobalto (capacidad de 10 mg de proteína marcada con HIS/mL de resina) y se lavó con Tris HCl 20 mM pH 8,0 (5 CV). La proteína marcada con HIS fue purificada mediante flujo por gravedad y a continuación se desalinizó en una columna PD-10 en 1 x PBS pH 7,2. Se determinó la concentración de la proteína mediante A₂₈₀. Se determinó la pureza mediante SDS-PAGE – tinción de plata y QuantiScan ©.

Ejemplo 2: Desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos de FABP1

30 Se formuló una disolución acuosa de FABP1 humana recombinante con Adyuvante Completo de Freund (FCA) para formar una emulsión que consistía en 0,1 mg/mL de inmunógeno en FCA al 50% (v/v). Se inmunizaron tres ovejas con dicha emulsión, inyectándose 0,25 mL intramuscularmente en cuatro sitios del costado de cada animal. Las inmunizaciones posteriores (recuerdos) estaban compuestas de 0,05 mg/mL de inmunógeno, emulsionado en 50% (v/v) de Adyuvante Incompleto de Freund (FIA), y se administraron de la misma manera mensualmente hasta
35 confirmar una respuesta policlonal. A continuación se recuperaron los nodos linfáticos tras inmunización subcutánea de otros dos recuerdos adicionales en las regiones axilar y pre-escapular de cada animal.

Los nodos linfáticos recolectados fueron perfusionados con medio y diseccionados usando tijeras y fórceps para aislar los linfocitos. Se llevó a cabo la fusión de los linfocitos aislados con una línea de células de heteromioma en una relación de aproximadamente 2:1 mediante la adición de polietilén glicol 1500 (PEG). Las fusiones resultantes se transfirieron a placas de 96 pocillos (7x) en DMEM P/S al 20%, con x1 hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT).
40 Al día 7, se rellenó el medio de todas las placas de fusión con DMEM P/S al 20%, con x1 HAT, y en el día 14 se retiraron 180 μ L/pocillo de sobrenadante y se usaron en un escrutinio de los sobrenadantes de cultivo de hibridoma mediante ELISA. Se seleccionaron los hibridomas que presentan especificidad para FABP1.

Se clonaron los hibridomas positivos para producir hibridomas monoclonales estables usando metilcelulosa al 1% a 37°C, con un 5% de CO₂. Se identificaron dos líneas celulares, P2386 y P2388, que cumplían las especificaciones y
45 se clonaron por triplicado antes de ser clonadas mediante dilución limitada.

Ejemplo 3: Caracterización de anticuerpos monoclonales de FABP1

A continuación se evaluaron anticuerpos monoclonales purificados de los hibridomas P2386 y P2388 (ver más arriba) en ensayos de unión directa con esta familia de proteínas de FABP recombinantes usando 1 μ g/mL de monoclonal y una valoración de cada variante de FABP para confirmar la especificidad. Los resultados se muestran
50 a continuación en la Tabla 1.

Una evaluación analítica adicional demostró que los anticuerpos monoclonales eran específicos de FABP1, exhibiendo una reactividad cruzada de <0,1% para FABP2, FABP3, FABP4, FABP5, FABP6, FABP7, FABP8, FABP9 y mioglobina. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 2.

Tabla 1

		P2386 @ 1 µg/mL MAP-DAS-094 @ 1:5K											
Suministrador	Nº catálogo	ng/mL	1582,28	500,72	158,46	50,14	15,87	5,02	1,59	0,50	0,16	0,05	0
BioVendor	RD172240100	FABP-Hígado	2,498	2,283	1,770	1,170	0,650	0,325	0,204	0,198	0,130	0,089	0,065
R&D Systems	2694-CL/CF	FABP-Recombinante	0,062	0,063	0,054	0,070	0,059	0,051	0,061	0,064	0,056	0,067	0,061
Capricorn	FAB-063	FABP-Cardiaca	0,088	0,068	0,056	0,069	0,078	0,047	0,057	0,054	0,066	0,063	0,062
BioVendor	RD172036100	FABP-Adiposa	0,059	0,059	0,055	0,070	0,058	0,057	0,062	0,053	0,063	0,067	0,058
BioVendor	RD172060100	FABP-Epidérmica	0,065	0,062	0,059	0,071	0,051	0,056	0,065	0,071	0,068	0,054	0,057
Randox	PAS10094	FABP-Íleo	0,064	0,063	0,056	0,068	0,057	0,057	0,064	0,062	0,060	0,065	0,058
Abnova	H00002173-P01	FABP-Cerebro	0,076	0,064	0,054	0,068	0,062	0,048	0,067	0,062	0,066	0,062	0,059
Randox	PAS10092	FABP-Mielina	0,092	0,062	0,059	0,079	0,068	0,054	0,048	0,067	0,061	0,071	0,053
		P2388 @ 1 µg/mL MAP-DAS-094 @ 1:5K											
Suministrador	Nº catálogo	ng/mL	1582,28	500,72	158,46	50,14	15,87	5,02	1,59	0,50	0,16	0,05	0
BioVendor	RD172240100	FABP-Hígado	2,639	2,406	1,976	1,357	0,738	0,334	0,168	0,148	0,115	0,106	0,055
R&D Systems	2694-CL/CF	FABP-Recombinante	0,067	0,061	0,062	0,060	0,055	0,067	0,047	0,049	0,056	0,056	0,054
Capricorn	FAB-063	FABP-Cardiaca	0,062	0,055	0,063	0,057	0,053	0,077	0,049	0,046	0,052	0,056	0,050
BioVendor	RD172036100	FABP-Adiposa	0,064	0,058	0,058	0,061	0,054	0,055	0,059	0,049	0,055	0,053	0,048
BioVendor	RD172060100	FABP-Epidérmica	0,066	0,053	0,057	0,066	0,055	0,056	0,059	0,055	0,065	0,057	0,049
Randox	PAS10094	FABP-Íleo	0,066	0,054	0,056	0,056	0,059	0,054	0,049	0,054	0,057	0,052	0,049
Abnova	H00002173-P01	FABP-Cerebro	0,061	0,052	0,052	0,057	0,060	0,052	0,060	0,055	0,064	0,061	0,055
Randox	PAS10092	FABP-Mielina	0,079	0,075	0,064	0,075	0,061	0,058	0,066	0,069	0,062	0,069	0,059

Tabla 2

Reactivo cruzado	Concentración (ng/mL)	% de reactividad cruzada
FABP2	4000	0,03
FABP3	4000	0,07
FABP4	4000	0,02
FABP5	4000	0,03
FABP6	4000	0,06
FABP7	4000	0,03
FABP8	4000	0,05
FABP9	4000	0,07
Mioglobina	800	0,02

Ejemplo 4: Optimización y validación del ensayo de FABP1

5 Los anticuerpos monoclonales de FABP1 caracterizados fueron empleados en el desarrollo de un inmunoensayo tipo sándwich de biochip. El ensayo se aplicó al analizador “Evidence Investigator” (disponible en Randox Laboratories), que utiliza la tecnología de conjunto de biochips, basado en los principios de inmunoensayos ELISA.

10 Se completó el mapeado de epítomos de captura y de anticuerpos detectores/trazadores usando los péptidos solapantes derivados de FABP1 y se estableció que la captura y los anticuerpos detectores/trazadores se unen a las regiones N- y C-terminales de FABP1, respectivamente. Se emplearon inmunoensayos basados en biochip para evaluar el rendimiento analítico del par de anticuerpos, se aplicó el ensayo al analizador “Evidence Investigator”. El ensayo de FABP1 demostró un valor de sensibilidad de 0,66 ng/mL con un rango de ensayo de 0 – 400 ng/mL.

15 Antes del análisis, se activó la superficie como se describe en Fitzgerald S.P. *et al*, Clin. Chem. 51(7); 1165-1176; 2005. Se aplicaron 10 nL de anticuerpo de captura a 0,32 mg/mL en tampón de carbonato, pH 9,6. Los biochips cargados fueron bloqueados con caseína al 2% en tampón de carbonato durante una hora a temperatura ambiente y después se lavaron con PBS. A continuación se estabilizaron, se secaron a 37°C, se trocearon y se montaron en portadores, antes de ser sellados al vacío para almacenamiento a 2-4°C.

20 El ensayo de FABP1 se diseñó para ser específico para FABP1. La especificidad del ensayo se evaluó determinando la reactividad cruzada con un panel de proteínas FABP y analitos relacionados (Tabla 2). Para cada uno de los analitos del panel, se añadieron 4000 ng/mL del analito al suero de calibración. Esto es equivalente a 10 veces el nivel superior de cuantificación de FABP1. Se introdujo mioglobina, un analito relacionado pero no una FABP, en una concentración de 800 ng/mL. No se observó ninguna reactividad cruzada con ninguno de los reactivos evaluados. Estos datos validan que el ensayo es específico de FABP1. La especificidad del ensayo de FABP1 se evaluó midiendo la unión no específica del conjugado con los componentes del ensayo que no eran diana. Se evaluó el conjugado de FABP1 contra los otros componentes del panel H-FABP3, B-FABP7 y M-FABP8. El conjugado L-FABP1 se corrió contra antígenos y anticuerpos de captura de cada uno de los demás componentes del panel.

Ejemplo 5: Expresión de FABP1 en suero de pacientes con enfermedad renal

30 Se obtuvieron muestras de suero de pacientes que habían sido clasificados como Estadio 1, Estadio 2 o Estadio 3 usando el método de clasificación detallado anteriormente. Específicamente, la cohorte de muestras de ERC estudiada consistió en muestras de suero de pacientes masculinos y femeninos de más de 55 años de edad, e incluía muestras de ERC de Estadio 1, 2 y 3, según se define en las guías médicas.

La tasa de filtración glomerular estimada (EGFR) se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula, descrita por Levey *et al* (Ann Intern Med 1999; 130(6): 461-70):

$$\text{EGFR} = 186 \times (\text{creatinina} / 88,4) - 1,154 \times (\text{edad}) - 0,203 \times [(0,742 \text{ si es mujer}) \times (1,210 \text{ si es de raza negra})]$$

en donde la creatinina se mide en micromoles/litro.

35 La cohorte de muestras de ERC estaba compuesta por:

69 muestras de suero en total (33 hombres y 36 mujeres)

- 20 pacientes de ERC en estadio 1 (edad media 63 años)
- 20 pacientes de ERC en estadio 2 (edad media 66 años)

- 20 pacientes de ERC en estadio 3 (edad media 72 años)
- 9 controles de donante (edad media 59 años)

En todas las muestras se determinó el nivel de FABP1, cistatina C, creatinina, AST y γ -GT.

5 Estas muestras, junto con el suero de donantes sanos, fueron evaluadas usando la invención descrita para
determinar la concentración de FABP1 en una matriz de base sanguínea. Los niveles de FABP1 medidos con el
ensayo en las muestras de pacientes con enfermedad renal fueron comparados con los niveles de FABP1 de las
muestras tomadas de donantes sanos. La significación de los resultados se determinó usando un test de Kruskal-
Wallis (J American Stat Assoc 1952; 47: 583-621) seguido de comparación post hoc Mann-Whitney (Ann Math Stats
1947; 18: 50-60) (corregidas usando el método de Bonferonni (Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze
10 Economiche e Commerciali di Firenze 1936; 8: 3-62)). Los resultados demostraron que la invención descrita fue
capaz de identificar los pacientes de enfermedad renal en todos los estadios de la enfermedad. Los niveles de
FABP1 eran significativamente elevados en los pacientes de Estadio 1 ($p < 0,001$, $n=20$), Estadio 2 ($p < 0,001$, $n=20$) y
Estadio 3 ($p < 0,001$, $n=20$), en comparación con el grupo de control ($n=9$). Además, el suero procedente de pacientes
de enfermedad renal en Estadio 3 contenía niveles superiores de FABP1 que los pacientes de enfermedad renal en
15 Estadio 1 ($p < 0,01$, $n=20$) y Estadio 2 ($p < 0,05$, $n=20$), sin observarse diferencias significativas entre los pacientes de
Estadio 1 y los de Estadio 2. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 3 y en la Figura 2.

Tabla 3

FABP1 (ng/mL)				
	Control	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3
Mediana	10	41,45	46	147,2
Mínimo	3,6	11,9	8,4	31
Máximo	19,6	178,3	586,9	522,5
Rango	3,6-19,6	11,9-178,3	8,4-586,9	31-522,5
n=	9	20	20	20
Valor p (corregido)		< 0,001	< 0,001	< 0,001

20 Esto también demostró una mayor sensibilidad para diagnosticar enfermedad renal en un estadio temprano que
otros marcadores para daño renal. Esto se demostró analizando muestras de suero de pacientes de enfermedad
renal en Estadio 1, Estadio 2 y Estadio 3, así como muestras tomadas de donantes sanos, para determinar los
niveles de creatinina y cistatina C usando el analizador RX Daytona (Randox, R.U.). Se determinaron los niveles de
dichos marcadores y se compararon con los niveles de control. No se observó ningún cambio significativo ni en la
cistatina C ni en la creatinina para la enfermedad renal de Estadio 1 o de Estadio 2 con respecto al grupo de control.
25 Sin embargo, los niveles de cistatina C y de creatinina fueron significativamente elevados en el grupo de enfermedad
renal de Estadio 3 en comparación con los controles. Estos datos se muestran en las Tablas 4 y 5 a continuación, y
en las Figuras 3 y 4. Estas comparaciones se basaron en los niveles de los analitos y no en si estaban por encima o
por debajo del rango normal sugerido por las instrucciones de uso suministradas por el fabricante. La comparación
entre los grupos de enfermedad y de control se usó simplemente para identificar los marcadores que pueden ser de
30 interés en estadios específicos de la enfermedad y no para clasificar pacientes. Estos datos sugieren que la
invención descrita actúa como un indicador temprano para la diagnosis de enfermedad renal y mejora los resultados
de las técnicas conocidas actualmente en el campo para la diagnosis de disfunción renal.

Tabla 4

Cistatina C (mg/L)				
	Control	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3
Mediana	0,74	0,74	0,82	1,21
Mínimo	0,54	0,4	0,58	0,75
Máximo	0,84	0,99	1,04	2,38
Rango	0,54-0,84	0,4-0,99	0,58-1,04	0,75-2,38
n=	9	19	20	20
Valor p (corregido)		0,99	0,123	< 0,001

Tabla 5

Creatinina ($\mu\text{mol/L}$)				
	Control	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3
Mediana	84,55	82,94	97,1	137,2
Mínimo	59,55	67,72	69,23	85,26
Máximo	93,42	107,5	124,4	257,2
Rango	59,55-93,42	67,72-107,5	69,3-124,4	85,26-257,2
n=	9	20	20	20
Valor p (corregido)		0,96	0,078	< 0,001

Se ha argumentado previamente que los niveles en suero de FABP1 tienen una utilidad limitada para diagnosticar la enfermedad renal debido a que la FABP1 también se produce en respuesta a la enfermedad hepática. Para solventar este potencial problema, las muestras de suero de los grupos de enfermedad renal y de control fueron analizados usando el analizador RX Imola (Randox, R.U.) para determinar los niveles de indicadores conocidos para el daño hepático, AST y γ -GT. Ni AST ni γ -GT demostraron una correlación significativa con FABP1 en los grupos de enfermedad renal y de control. Además, no se observó ningún cambio significativo en el nivel de AST o de γ -GT en los pacientes diagnosticados con ERC de Estadio 1, Estadio 2 o Estadio 3 en comparación con el control. Estos datos se muestran en las Tablas 6 y 7 a continuación, y en las Figuras 5 y 6. Estos datos enfatizan adicionalmente la utilidad del nivel de FABP1 en suero para el diagnóstico de la enfermedad renal.

Tabla 6

AST (U/L)				
	Control	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3
Mediana	17	17	16	14
Mínimo	13	7	11	9
Máximo	22	32	53	72
Rango	13-22	7-32	11-53	9-72
n=	9	20	20	20
Valor p (corregido)		1	1	0,8

Tabla 7

gamma-GT (U/L)				
	Control	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3
Mediana	24	36	26,5	37,5
Mínimo	10	9	11	10
Máximo	109	136	216	422
Rango	10-109	9-136	11-216	10-422
n=	9	20	20	20
Valor p (corregido)		1	1	0,93

Ejemplo 6: Expresión de FABP1 en suero de pacientes con síndrome metabólico

Se obtuvieron muestras de suero de pacientes que habían sido clasificados con síndrome metabólico usando el método de clasificación detallado anteriormente. Estas muestras, junto con sueros de donantes sanos, fueron evaluadas usando la invención descrita para determinar la concentración de FABP1 en una matriz sanguínea. Los niveles de FABP1 medidos en el ensayo en las muestras de pacientes con síndrome metabólico fueron comparados con los niveles de FABP1 de las muestras tomadas de donantes sanos. Se determinó la significación de los resultados usando un test de Mann-Whitney. Los resultados demostraron que la invención descrita fue capaz de identificar pacientes con síndrome metabólico en comparación con los grupos de control. Los sueros tomados de pacientes metabólicos contenían niveles significativamente más altos de FABP1 ($p < 0,001$, $n=90$) que los observados en controles sanos ($n=40$; Tabla 8).

También la midió la concentración de marcadores de disfunción renal en las muestras procedentes de pacientes de síndrome metabólico y en las de voluntarios sanos. La concentración en suero de cistatina C resultó ser significativamente mayor en el grupo de síndrome metabólico que en el de voluntarios sanos ($p < 0,001$, $n=90$, Tabla 9).

5 **Tabla 8**

FABP1 (ng/mL)		
	Control	Metabólico
Mediana	10,53	77,19
Mínimo	4,97	5,48
Máximo	49,78	603,1
Rango	4,97-49,78	5,48-603,1
n=	40	90
Valor p		< 0,001

Tabla 9

Cistatina C (mg/L)		
	Control	Metabólico
Mediana	0,775	0,885
Mínimo	0,6	0,54
Máximo	0,96	1,65
Rango	0,6-0,96	0,54-1,65
n=	40	90
Valor p		< 0,0001

10 Cabe destacar que los niveles de creatinina resultaron ser significativamente menores en comparación con el grupo de control ($p < 0,001$, $n=90$, Tabla 10). Los niveles de creatinina reducidos pueden ser un indicio de función hepática reducida, causada por daño hepático, por lo tanto esto destaca que se deben tomar en consideración otros factores para descartar/considerar una potencial enfermedad hepática como patología concomitante.

Tabla 10

Creatinina ($\mu\text{mol/L}$)		
	Control	Metabólico
Mediana	83	71
Mínimo	51	39
Máximo	106	131
Rango	51-106	39-131
n=	40	90
Valor p		< 0,0001

15 Los niveles de FABP1 no mostraron ninguna correlación significativa con los marcadores de enfermedad hepática, tales como AST y γ -GT, en las muestras de suero metabólicas y de donante sano, tal como se muestra a continuación en las Tablas 11 y 12. Además de esto, no se produjo ningún incremento significativo de los niveles de AST en suero entre los pacientes metabólicos y los de control. Sin embargo, sí había un aumento significativo en la
 20 concentración de γ -GT en suero de los pacientes metabólicos en comparación con el grupo de control ($p=0,0056$, $n=90$). Esto sugiere que para los pacientes de síndrome metabólico, la determinación de un aumento en FABP1 debe ser validada con la determinación de creatinina, cistatina C, γ -GT y AST para poder asegurar si el incremento del nivel de FABP1 puede deberse a una enfermedad hepática subyacente, a una disfunción renal o a ambas enfermedades simultáneas.

Tabla 11

AST (U/L)		
	Control	Metabólico
Mediana	19,5	17
Mínimo	0	5
Máximo	70	91
Rango	0-70	5-91
n=	40	90
Valor p		0,22

Tabla 12

gamma-GT (U/L)		
	Control	Metabólico
Mediana	28	42
Mínimo	10	11
Máximo	187	339
Rango	10-187	11-339
n=	40	89
Valor p		0,0056

5 Ejemplo 7: Determinación de los umbrales de FABP1 y clasificación de estadio de la ERC

Se empleó el análisis de curvas receptor-operador (CRO) para determinar la especificidad y la sensibilidad de la invención propuesta, en primer lugar para discriminar entre los grupos de control y todos los pacientes de ERC (Figura 12), y en segundo lugar para discriminar entre ERC de Estadio 1 (Figura 13), Estadio 2 (Figura 14) y Estadio 3 (Figura 15). Las áreas bajo la curva (ABC) para la CRO correspondiente a FABP1, empleadas para discriminar entre los grupos de control y los pacientes con enfermedad renal, fue de 0,983 para mujeres (Valor de corte >15,65 ng/mL, Sensibilidad = 0,967, Especificidad = 1,00) y 0,98 para hombres (Valor de corte >21,6 ng/mL, Sensibilidad = 0,933, Especificidad = 1,00). La FABP1 mostró un ABC respectiva para mujeres y hombres de 0,83 (Valor de corte > 75,8 ng/mL, Sensibilidad = 0,7, Especificidad = 0,9) y de 0,76 (Valor de corte > 151,9, Sensibilidad = 0,5, Especificidad = 0,9) para discriminar entre ERC de Estadio 2 y de Estadio 3. Estos niveles fueron determinados usando una cohorte de muestras tomadas de una población distinta, y por tanto los rangos normales deberían ser calculados por el usuario final.

El uso de medidas cuantitativas de FABP1 en combinación con otros marcadores potenciales de ERC tales como cistatina C y creatinina permite la discriminación entre pacientes de estadio 1 y pacientes de estadio 2. La principal diferenciación clínica entre el Estadio 1 y el Estadio 2 es el estatus de GFR. La GFR estimada se basa en los niveles en suero de cistatina C o de creatinina, estando las concentraciones en suero relacionadas inversamente con la GFR. Por lo tanto, un nivel elevado de FABP1 (por encima del valor de corte inferior pero por debajo del valor de corte superior) combinado con un nivel elevado de cistatina C y/o de creatinina en comparación con los niveles sugeridos en las instrucciones de uso suministradas por el fabricante clasificaría al paciente como ERC en Estadio 2, mientras que un nivel elevado de FABP1 (por encima del valor de corte inferior pero por debajo del valor de corte superior) y una concentración de cistatina C y creatinina en el rango normal se clasificaría como ERC en Estadio 1. Los pacientes de Estadio 3 se clasifican en base a presentar una concentración de FABP1 por encima del valor de corte superior y una concentración de creatinina y/o cistatina C por encima del rango normal sugerido por las instrucciones de uso.

30 Ejemplo 8: Algoritmo que utiliza los niveles en suero de FABP1 y otros analitos para predecir la gravedad de la enfermedad ERC

Se emplearon varios métodos para identificar un panel óptimo de biomarcadores múltiples que diferenciases de forma precisa entre ERC y controles sanos, así como para estratificar el estadio de la enfermedad ERC. Lo primero se hizo identificando marcadores que fuesen identificados individualmente con un valor predictivo significativo mediante estadística univariable estándar, tal como mediante análisis de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Esto identificó el nivel de FABP1 como significativamente incrementado en expresión en el suero de todos los estadios de ERC (1, 2 y 3) en comparación con el suero de voluntarios sanos. Además, los niveles de FABP1 son

significativamente mayores en el suero de pacientes de ERC de Estadio 3 en comparación con ERC de Estadio 1 y Estadio 2. El nivel en suero tanto de creatinina como de cistatina C era significativamente mayor en los pacientes de ERC de Estadio 3 en comparación con los voluntarios sanos, mientras que los niveles de AST y γ -GT no se vieron alterados en ningún estadio de la enfermedad en comparación con el control (a pesar de esto, es importante mantenerlos para descartar enfermedad hepática). Se determinaron los valores de corte para el nivel de FABP1 (tal como se describe en el ejemplo 7) mientras que los valores de corte para el nivel de creatinina, cistatina C, AST y γ -GT se definieron a través de las instrucciones de uso del respectivo ensayo proporcionadas por el fabricante (Randox, R.U.), y se usó un algoritmo de clasificación basado en dichos umbrales para predecir el estado de la enfermedad en base a estos 5 marcadores. Esto dio como resultado un algoritmo que predice correctamente la gravedad de la enfermedad el 71,5% de las veces.

A continuación se empleó una regresión logística multinomial para investigar si se podría desarrollar un algoritmo avanzado para identificar la importancia de cada marcador. Se desarrolló un modelo factorial completo usando la concentración de FABP1, creatinina, cistatina C, AST y γ -GT para cada estado de la enfermedad y para el grupo de control, ya que muchos de estos marcadores están influidos por el género éste se usó como factor en el análisis. Dicho análisis demostró que todas las co-variables y factores (con la excepción de la cistatina C) tenían un efecto significativo en el modelo. Éste identificó el nivel de FABP1 y el de creatinina como los predictores más potentes para el estadio de la enfermedad. Usando los coeficientes de regresión (*b*) estimados, se pudieron calcular las ratios de probabilidad estimadas para cada categoría (no-ERC [Control], Estadio 1, Estadio 2 y Estadio 3). Estas ratios pudieron usarse entonces para calcular las probabilidades estimadas de predecir la categoría más probable a la que poder asignar a un paciente, en base a las concentraciones de FABP1, creatinina, cistatina C, AST y γ -GT. Usando este modelo, se pudo predecir el estado de la enfermedad en un nivel del 86,2%.

Finalmente, se desarrolló una red neuronal usando aprendizaje de retro propagación. Se usó un conjunto de datos más pequeño asignado aleatoriamente para entrenar un perceptrón multicapa, que fue validado a continuación contra una muestra de datos mantenida. Nuevamente, se identificó la concentración de FABP1 y de creatinina como los factores más importantes para determinar el estado de enfermedad. Usando una combinación de la concentración de los 5 marcadores, así como tomando en consideración el género, este modelo pudo predecir el estado de enfermedad con una precisión del 84%. Aunque algunos marcadores no son tan importantes como otros, se observó que eliminarlos no mejoraba la precisión.

Los resultados proporcionados en los ejemplos demuestran que el método de la presente invención presenta una mejor discriminación entre las etapas tempranas de la ERC y los controles que los métodos previos de la técnica, lo que sugiere que la invención actual puede usarse para ayudar en el diagnóstico de la ERC, proporcionando de este modo un avance en el diagnóstico clínico. El método de la presente invención también puede usarse para estratificar pacientes en grupos que presenten un mayor riesgo de desarrollar ERC como enfermedad concomitante y proporciona un medio para determinar la velocidad de progresión de la ERC, permitiendo así al médico clasificar los pacientes que necesitan una monitorización más estrecha y gestionarlos clínicamente.

Una ventaja de los métodos de la presente invención es que el nivel de FABP1 en suero no requiere una corrección por dilución, como ocurre en los biomarcadores urinarios de la técnica anterior. El uso de una corrección por dilución, p.ej., creatinina, presenta fallos de fundamento, puesto que el marcador de corrección está influido directamente por la función renal. La FABP1 en suero, por tanto, evita esta limitación. Se analizaron 60 muestras de suero de pacientes con enfermedad renal y no se observó dicho efecto. Esto indica que el suero es una matriz más adecuada que la orina para el diagnóstico y clasificación de la enfermedad renal. De hecho, los resultados presentados en los ejemplos demuestran que el incremento progresivo del nivel de FABP1 en suero asociado a la progresión de la enfermedad es mucho más resistente a cambios patológicos variables dentro del riñón y, por tanto, también será adecuado para la clasificación de ERC cuando la función renal esté seriamente afectada.

Tabla 13

Biomarcador	Hombre	Mujer	Unidades	Analizador
Cistatina C	0,57 - 1,05	0,57 - 1,05	mg/L	RX Daytona, Randox
Creatinina	53 - 97	44 - 80	μ mol/L	RX Daytona, Randox
AST	<37	<31	U/L	RX Imola, Randox
γ -GT	11,0 - 50	7,0 - 32	U/L	RX Imola, Randox

REIVINDICACIONES

1. Un método para clasificar un paciente que padece de enfermedad renal crónica (ERC) en uno de los estadios 1-3 de la ERC, que comprende determinar el nivel de los biomarcadores FABP1, γ -GT, AST, creatinina y cistatina C en una muestra de suero obtenida del paciente.
- 5 2. El método de la reivindicación 1, que además comprende el uso de un algoritmo de clasificación, derivado usando regresión logística, árboles de decisión, máquinas de vector de soporte, redes neuronales, bosque aleatorio u otro algoritmo de aprendizaje de máquina.
- 10 3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde el nivel de los biomarcadores FABP1, γ -GT, AST, creatinina y cistatina C en una muestra obtenida del paciente es comparado con un rango de valores de control para cada biomarcador, en donde un nivel incrementado de FABP1 en comparación con un umbral inferior del rango de valores de control de FABP1 y niveles de γ -GT, AST, creatinina y cistatina C dentro del rango de valores de control de cada biomarcador indican que el paciente padece ERC de estadio 1, un nivel incrementado de FABP1 en comparación con un umbral inferior de los valores de control para FABP1, niveles de γ -GT y AST dentro del rango de valores de control para cada biomarcador, y niveles incrementados de creatinina y cistatina C en comparación con un umbral superior del rango de valores de control para dichos biomarcadores indican que el paciente padece ERC de estadio 2, o en donde un nivel incrementado de FABP1 en comparación con el umbral superior del rango de valores de control de FABP1 y niveles incrementados de creatinina y cistatina C en comparación con un umbral superior del rango de valores de control para dichos biomarcadores indican que el paciente padece ERC de estadio 3 o superior.
- 15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde un nivel de FABP1 entre aproximadamente 15 ng/mL y 75 ng/mL (mujeres) o de 21 ng/mL a 151 ng/mL (hombres) indica que el paciente tiene ERC de Estadio 1 o de Estadio 2, un nivel de FABP1 por encima de aproximadamente 75 ng/mL (mujeres) o 151 ng/mL (hombres) indica que el paciente tiene ERC de Estadio 3 o por encima.
- 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el paciente tiene una enfermedad concomitante para una enfermedad o lesión renal seleccionada del grupo que consiste en enfermedad renal crónica (ERC), insuficiencia renal aguda (IRA), nefropatía diabética, glomerulonefritis, glomeruloesclerosis focal, nefropatía compleja inmune, lupus nefritis, lesión renal inducida por fármacos, o se caracteriza como síndrome nefrótico o insuficiencia renal o está causada por un rechazo de injerto de riñón.
- 25 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el paciente presenta síndrome metabólico.
- 30 7. Un método para determinar si un paciente tiene, o está en riesgo de desarrollar, una disfunción renal que comprende la determinación del nivel de FABP1 en una muestra de suero procedente del paciente poniéndola en contacto un dispositivo de estado sólido que comprende un sustrato que tiene una superficie activada que tiene un anticuerpo de FABP1 inmovilizado en áreas discretas de la superficie activada, y comparar el nivel de FABP1 de la muestra con un valor de control de FABP1, en donde un aumento del nivel de FABP1 en comparación con el valor de control indica que el paciente tiene, o está en riesgo de desarrollar, una disfunción renal.
- 35 8. El método de la reivindicación 7, en donde un nivel de FABP1 de aproximadamente 15 ng/mL y 75 ng/mL (mujeres) o de 21 ng/mL a 151 ng/mL (hombres) indica que el paciente tiene ERC de Estadio 1 o de Estadio 2, un nivel de FABP1 por encima de aproximadamente 75 ng/mL (mujeres) o 151 ng/mL (hombres) indica que el paciente tiene ERC de Estadio 3.
- 40 9. El método de la reivindicación 7 u 8, en donde la disfunción renal es una enfermedad o lesión renal seleccionada del grupo que consiste en enfermedad renal crónica (ERC), insuficiencia renal aguda (IRA), nefropatía diabética, glomerulonefritis, glomeruloesclerosis focal, nefropatía compleja inmune, lupus nefritis, lesión renal inducida por fármacos, o se caracteriza como síndrome nefrótico o insuficiencia renal o está causada por un rechazo de injerto de riñón.
- 45 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que además comprende la etapa de determinar el nivel de creatinina o de cistatina C en una muestra aislada del paciente y comparar el nivel de creatinina o de cistatina C en la muestra con un rango de control, en donde un incremento del nivel de creatinina o de cistatina C en la muestra en comparación con el rango de control indica que el paciente tiene ERC de estadio 2 o superior.
- 50 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que además comprende la etapa de determinar el nivel de γ -GT o AST en una muestra aislada del paciente, en donde si el nivel de γ -GT o AST está dentro de los niveles de γ -GT o AST de un rango de control entonces el incremento del nivel de FABP1 no se debe a enfermedad hepática.
- 55 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el paciente tiene síndrome metabólico.
13. Un método para determinar la eficacia de un tratamiento con fármacos para la ERC o la disfunción renal, que comprende, en una muestra de suero tomada de un sujeto tratado con el fármaco, la comparación del nivel de FABP1 con el de una muestra no tratada, para determinar si el fármaco ha presentado el efecto de disminuir los

niveles de FABP1, en donde el nivel de FABP1 se determina usando un dispositivo de estado sólido que comprende un sustrato que tiene una superficie activada que tiene un anticuerpo de FABP1 inmovilizado en áreas discretas de la superficie activada.

5 **14.** Un método para determinar la eficacia de un tratamiento con fármacos para la ERC, que comprende clasificar a un paciente que padece ERC en uno de los estadios 1-3 de la ERC según el método definido en la reivindicación 1 antes y después del tratamiento, en donde una reducción del estadio de ERC, un retraso o una parada de la progresión hacia un estadio superior de ERC tras el tratamiento indica que el tratamiento ha tenido éxito.

10 **15.** Un método para determinar un protocolo de tratamiento con fármacos para un sujeto que padece ERC, que comprende, en una muestra de suero tomada de un sujeto tratado con el fármaco, comparar el nivel de FABP1 con el de una muestra no tratada, para determinar si el fármaco ha tenido el efecto de reducir los niveles de FABP1, en donde el nivel de FABP1 se determina usando un dispositivo de estado sólido que comprende un sustrato que tiene una superficie activada que tiene un anticuerpo de FABP1 inmovilizado en áreas discretas de la superficie activada, y seleccionar un protocolo de tratamiento con fármaco basado en si el sujeto presenta ERC de estadio 1, 2 o 3.

Figura 1

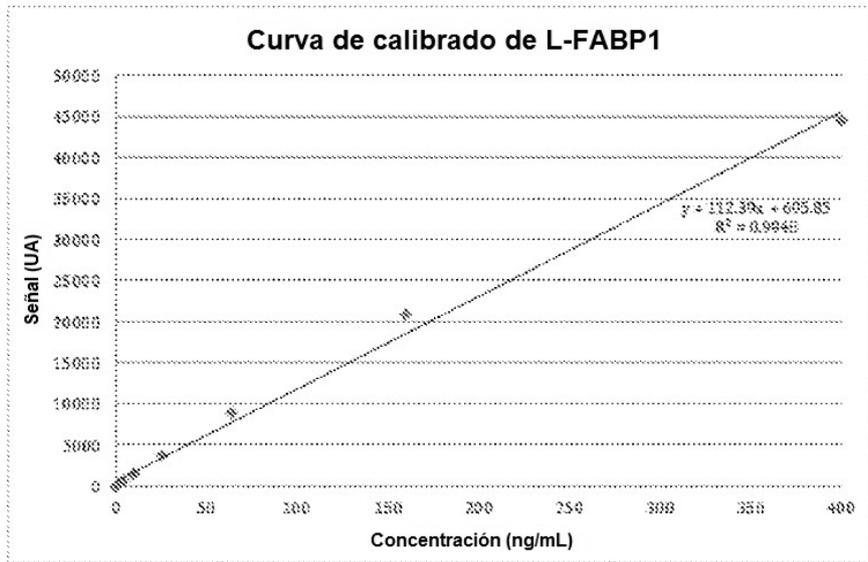


Figura 2

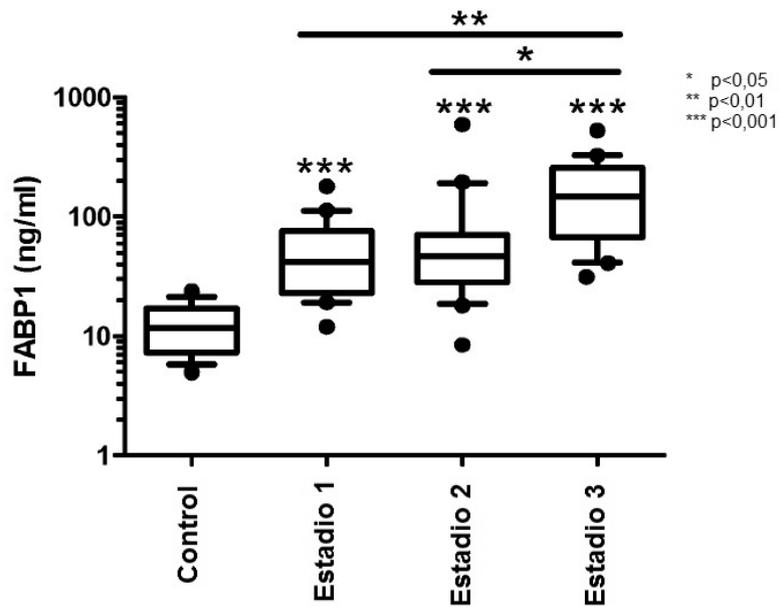


Figura 3

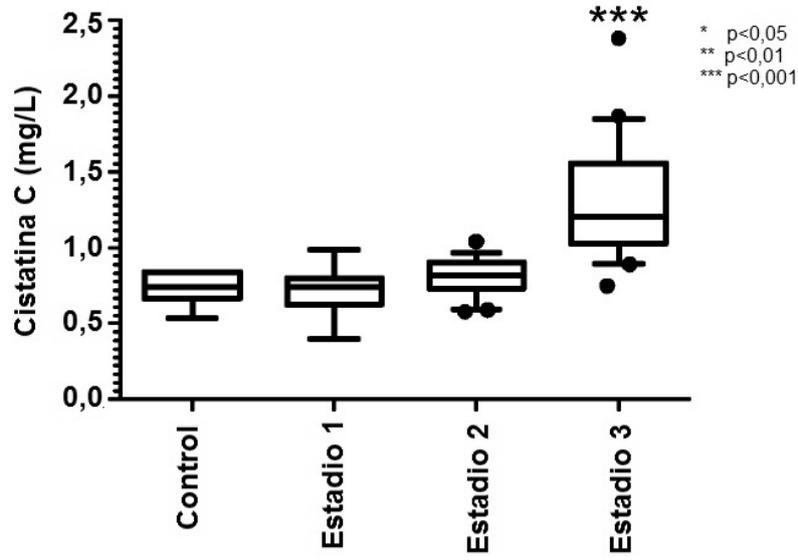


Figura 4

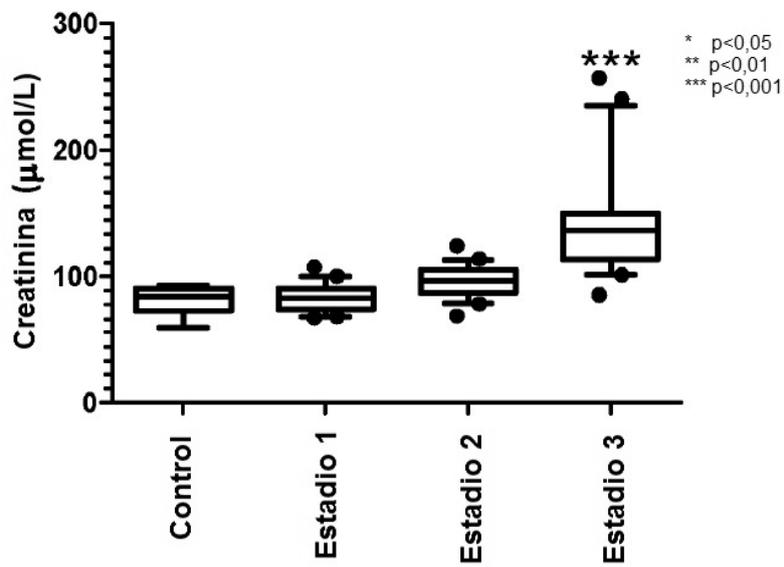


Figura 5

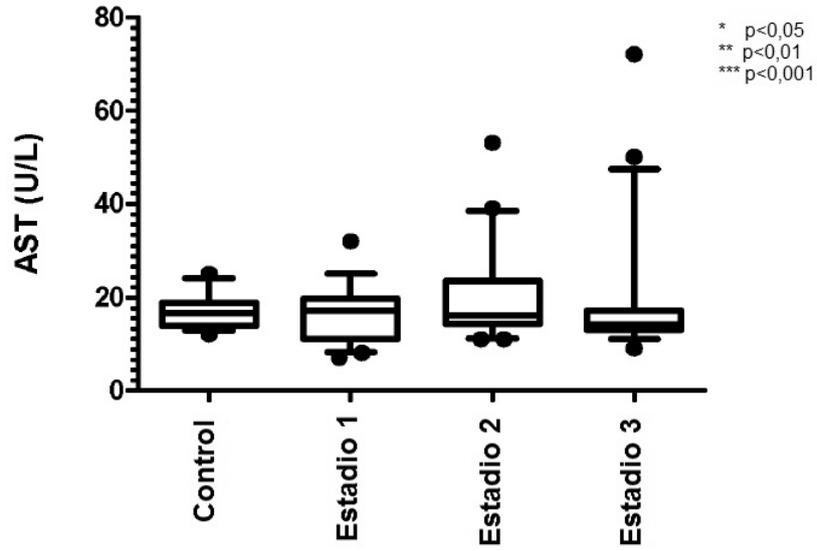


Figura 6

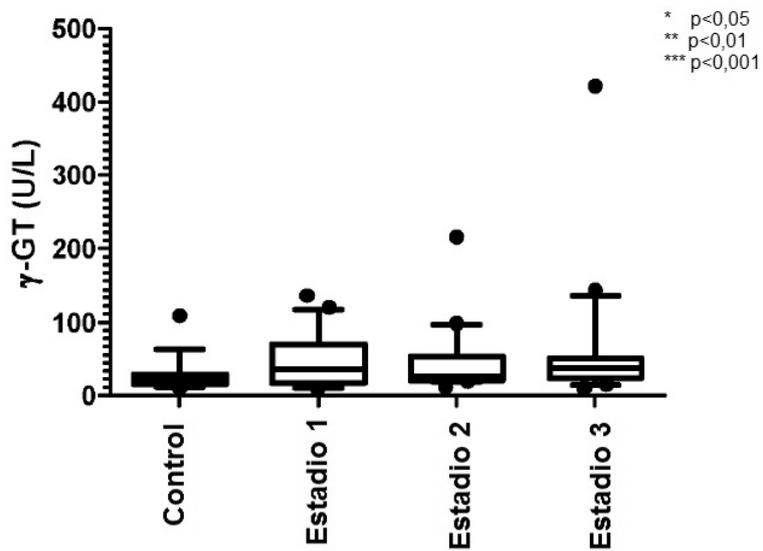


Figura 7

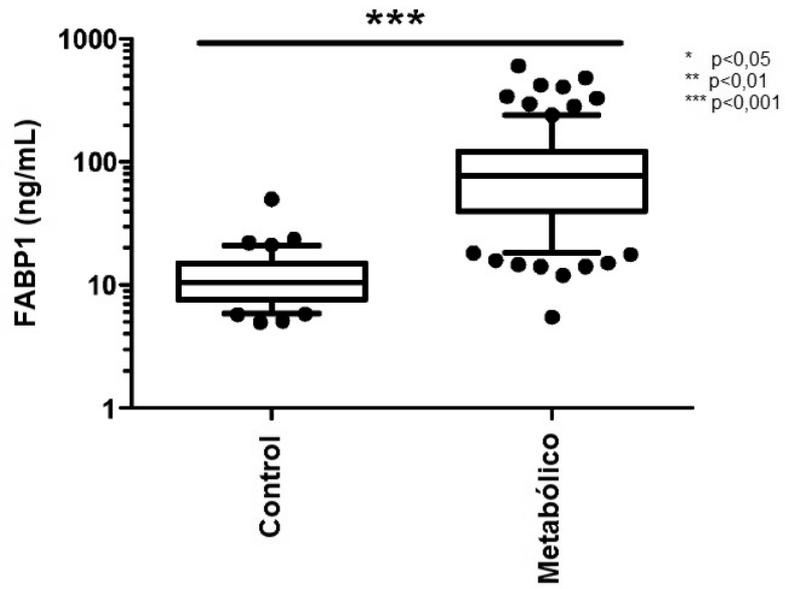


Figura 8

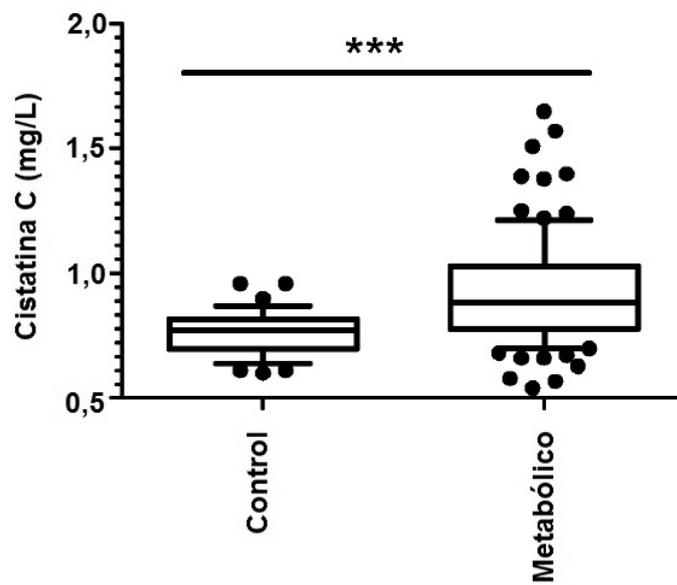


Figura 9

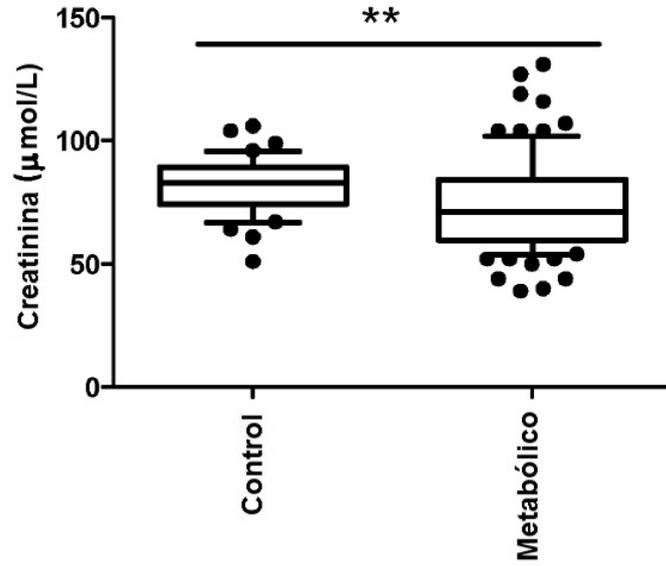


Figura 10

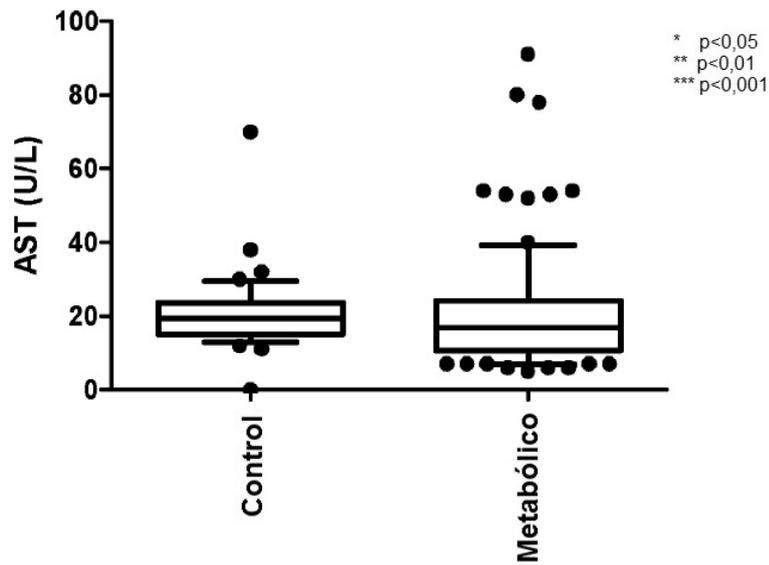


Figura 11

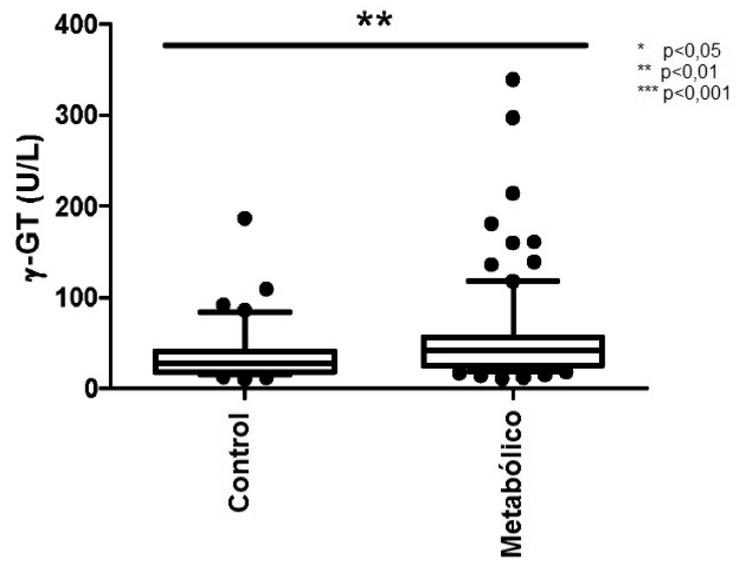


Figura 12

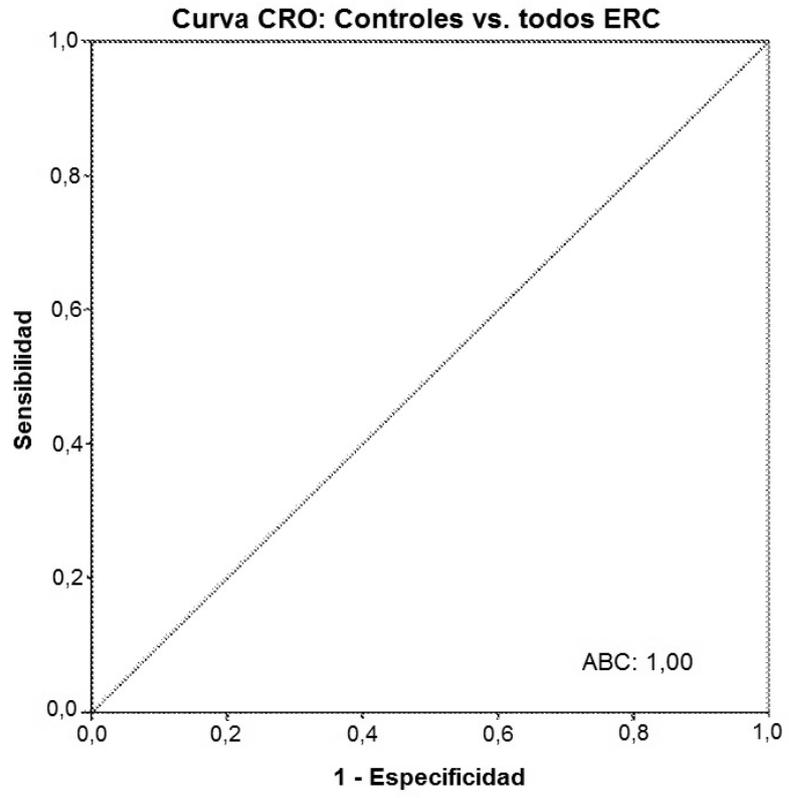


Figura 13

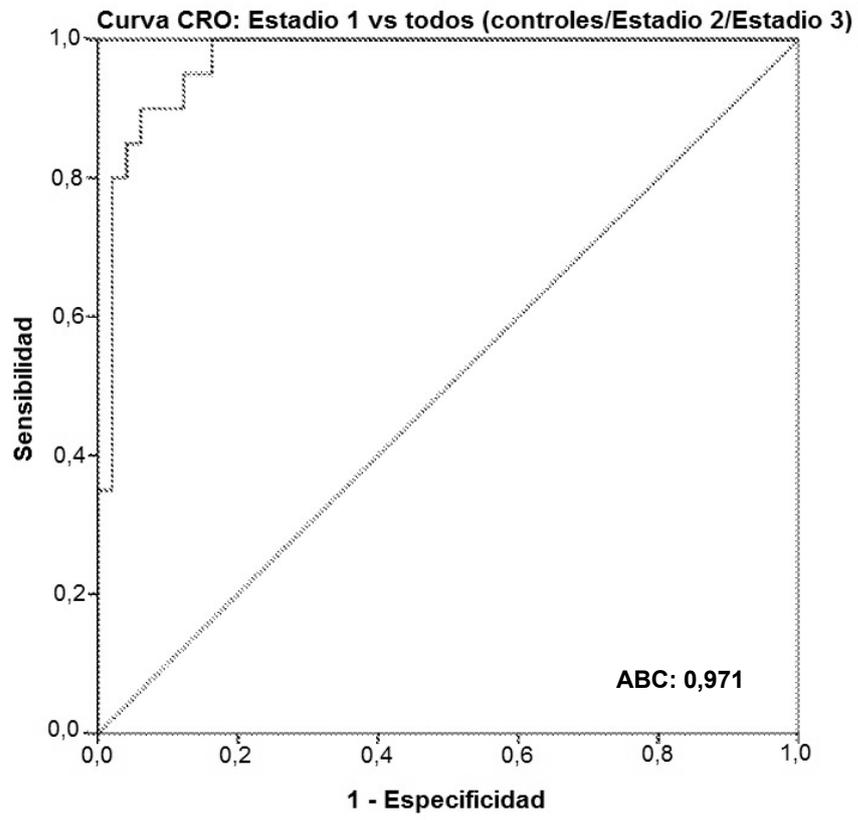


Figura 14

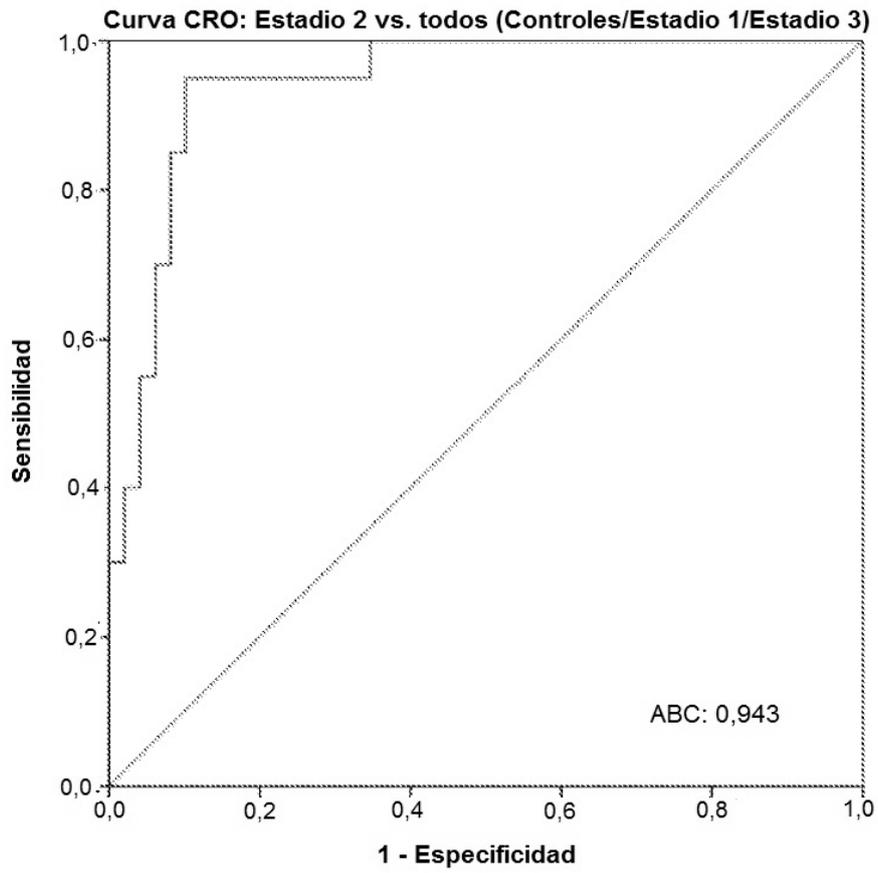


Figura 15

