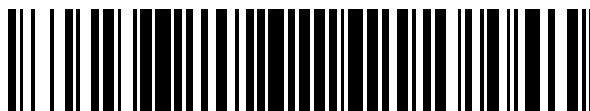


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 486**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2014** **E 16190959 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018** **EP 3133399**

54 Título: **Biomarcador de enfermedad renal crónica**

30 Prioridad:

04.10.2013 GB 201317621

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

21.11.2018

73 Titular/es:

RANDOX TEORANTA (100.0%)
Meenmore
Dungloe, Co. Donegal, IE

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 690 486 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

Biomarcador de enfermedad renal crónica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la enfermedad renal crónica y a métodos para su diagnóstico.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad renal es un término general que describe una clase de afecciones en las cuales los riñones no filtran ni retiran los productos de desecho de la sangre. Existen dos formas de enfermedad renal; insuficiencia renal aguda (IRA) y enfermedad renal crónica (ERC). La ERC generalmente es asintomática, excepto en su estado más avanzado. En consecuencia, generalmente se requieren análisis de sangre y/u orina para hacer un diagnóstico.

La definición de ERC desarrollada por la Iniciativa para la Calidad de la Evolución de la Enfermedad Renal (KDOQI, por sus siglas en inglés) fue:

1. Daño renal presente durante al menos 3 meses, según se define por anomalías estructurales o funcionales (generalmente se basa en un aumento de la albuminuria, p. ej., cociente albúmina/creatinina en orina [UACR] ≥ 30 mg/g) y/o
- 15 2. Tasa de filtración glomerular (TFG) < 60 ml/min/1,73 m² presente durante al menos 3 meses.

Dentro de este marco, KDOQI clasificó la ERC en cinco estadios, de la siguiente manera:

- Estadio 1: Daño renal con TFG ≥ 90 ml/min/1,73 m².
- Estadio 2: Daño renal con TFG 60-89 ml/min/1,73 m².
- 20 • Estadio 3: TFG 30-59 ml/min/1,73 m².
- Estadio 4: TFG 15-29 ml/min/1,73 m².
- Estadio 5: TFG < 15 ml/min/1,73 m² o insuficiencia renal tratada con diálisis o trasplante.

25 En Estados Unidos, según los datos del estudio National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2006 (NHANES), se estima que el 11,1 por ciento (22,4 millones) de adultos de 20 años o más tienen ERC en estadios 1-3. Otros 0,8 millones de adultos estadounidenses de 20 años o más tienen ERC en estadio 4 y más de 0,3 millones tienen ERC en estadio 5 y reciben hemodiálisis.

30 Los análisis de los datos de NHANES entre 1988-1994 y 1999-2004 sugieren que la prevalencia de ERC está aumentando para cada estadio de ERC, pero con un aumento particular en la prevalencia de individuos clasificados con ERC en estadio 3. El número de pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 5 que requieren diálisis también ha aumentado. Se ha estimado que más de 700.000 personas tendrán enfermedad renal en estadio terminal (ESRD, por sus siglas en inglés) para 2015.

35 Aunque la ERC puede ser causada por una enfermedad renal primaria (p. ej., enfermedades glomerulares, enfermedades tubulointersticiales, obstrucción y enfermedad renal poliquística), en la gran mayoría de los pacientes con ERC, el daño renal se asocia con otras afecciones médicas como la diabetes y la hipertensión. En 2008, excluyendo a aquellos con ESRD, el 48 por ciento de los pacientes de Medicare con ERC tenían diabetes, el 91 por ciento tenía hipertensión y el 46 por ciento tenía enfermedad cardíaca aterosclerótica. Otros factores de riesgo para ERC incluyen edad, obesidad, antecedentes familiares y etnia.

40 La ERC se ha asociado con numerosos resultados de salud adversos. Muchos estudios han dado a conocer que una TFG de 30-59 ml/min/1,73 m² se asocia con un mayor riesgo de mortalidad, enfermedad cardiovascular, fracturas, pérdida ósea, infecciones, deterioro cognitivo y fragilidad. De manera similar, parece existir una relación gradual entre la gravedad de la proteinuria o la albuminuria y resultados de salud adversos, incluida la mortalidad, la ESRD y la enfermedad cardiovascular. Además, el riesgo de resultados adversos conferidos por la reducción de la TFG y el aumento de la albuminuria (o proteinuria) parece ser independiente y multiplicativo.

45 La razón para considerar la detección de ERC en fase temprana incluye la alta y creciente prevalencia de ERC, sus conocidos factores de riesgo, sus numerosas consecuencias adversas para la salud, su larga fase asintomática, la disponibilidad de posibles pruebas de detección de ERC, y la disponibilidad de tratamientos que pueden alterar el curso de ERC en fase temprana y reducir las complicaciones de la ERC en fase temprana o sus problemas de salud asociados.

50 Algunas organizaciones ya recomiendan la detección de la ERC en poblaciones seleccionadas. El consorcio KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) recomienda la detección de todos los pacientes con hipertensión,

diabetes o enfermedad cardiovascular. La American Diabetes Association recomienda una detección anual de todos los adultos con diabetes, basado en "consenso de expertos o experiencia clínica". El Comité Nacional Conjunto de Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Presión Arterial Alta (JNC7, por sus siglas en inglés) recomienda la detección anual de todos los pacientes con hipertensión combinada y diabetes. La National Kidney Foundation, que aboga también por la detección selectiva, patrocina exámenes de detección gratuitos de ERC para todos los adultos con hipertensión, diabetes o un familiar primario con antecedentes de enfermedad renal, hipertensión o diabetes.

En la mayoría de los pacientes con ERC en estadios 1 a 3, la TFG disminuye lentamente. Sin embargo, la tasa de disminución varía entre las personas, y muchos factores parecen afectar a la progresión. Debido a que la ERC en estadios 1 y 2 generalmente progresa de manera asintomática, la detección de ERC en fase temprana requiere pruebas de laboratorio.

Algunas organizaciones recomiendan monitorizar los cambios en la función renal o el daño en pacientes con ERC. Por ejemplo, la Iniciativa para la Calidad de la Evolución de la Enfermedad Renal (KDOQI) recomienda al menos una medición anual estimada de la TFG en adultos con ERC para predecir el inicio de la ESRD y evaluar el efecto de los tratamientos de ERC. JNC7 recomienda la medición cuantitativa anual de albuminuria en todos los pacientes con "enfermedad renal". KDOQI también recomienda una monitorización más frecuente de pacientes con ERC con empeoramiento de la función renal.

A pesar de la importancia de medir los parámetros clínicos para la ERC en suero u orina, existen pocos ensayos diagnósticos para detectar ERC en fase temprana y monitorizar la progresión de esta enfermedad. La medición de la TFG no es lo suficientemente sensible para la detección temprana de la enfermedad renal, mientras que la medición de la proteína urinaria no es específica para la enfermedad renal, ni es adecuada para monitorizar la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, existe la necesidad de un marcador clínico o combinación de marcadores específicos y sensibles para el diagnóstico de ERC temprana y para la estadificación de la enfermedad renal.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona métodos para el diagnóstico de la enfermedad renal crónica. Más específicamente, la invención proporciona biomarcadores que proporcionan un medio para un diagnóstico temprano y estadificación de ERC.

La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de los autores de que se pueden detectar niveles alterados de biomarcadores individuales en suero de pacientes con ERC en estadio 1, estadio 2 y estadio 3 en comparación con el suero de individuos control. Los biomarcadores que se pueden detectar con niveles alterados en suero de pacientes con ERC en estadio 1, estadio 2 y estadio 3 en comparaciones con el suero de individuos control incluyen el complemento C3a(des)Arg (C3a desArg), interleucina 8 (IL-8), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP 1 α , por sus siglas en inglés), adiponectina (ADPN), dipeptidil peptidasa 4 (CD26), creatinina, proteína C reactiva (PCR), cistatina C (CISC), dímero D, factor de crecimiento endotelial (EGF, por sus siglas en inglés), E-selectina (ESEL), proteína de unión a ácidos grasos 1 (proteína de unión a ácidos grasos de hígado; FABP1 o LFABP, por sus siglas en inglés), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1, por sus siglas en inglés), interferón gamma (IFN γ), interleucina 10 (IL10), interleucina 15 (IL15), interleucina 1 alfa (IL1 α), interleucina 1 beta (IL1 β), interleucina 2 (IL2), interleucina 4 (IL4), interleucina 5 (IL5), interleucina 6 (IL6), L-selectina (LSEL), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP1, por sus siglas en inglés), metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9, por sus siglas en inglés), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL, por sus siglas en inglés), enolasa específica neuronal (NSE, por sus siglas en inglés), P-selectina (PSEL), interleuquina 2 alfa soluble (sIL2 α , por sus siglas en inglés), receptor de interleuquina 6 soluble (sIL6R, por sus siglas en inglés), receptor del factor de necrosis tumoral 1 soluble (STNFR1, por sus siglas en inglés), receptor del factor de necrosis tumoral 2 soluble (STNFR2), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) y molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM1, por sus siglas en inglés).

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para detectar la enfermedad renal crónica en un sujeto, que comprende medir la cantidad de un biomarcador en una muestra obtenida del sujeto, y determinar si la cantidad del biomarcador está alterada en comparación con un control normal, en donde el biomarcador es MIP 1 α .

En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para determinar la eficacia de un tratamiento para la enfermedad renal crónica, que comprende medir la cantidad de biomarcadores seleccionados en una muestra obtenida de un sujeto que recibe tal tratamiento, en donde los biomarcadores son MIP 1 α , IL8, IL1 β y CYSC; o VCAM1, MIP 1 α , IL8 y CYSC; o NSE, MIP 1 α , IL8 y CYSC; o NSE, VCAM1, MIP 1 α e IL8; o EGF, FABP1, IL8, sTNFR1, sTNFR2, dímero D, NGAL y MIP 1 α , y comparar el nivel de los biomarcadores con el de una muestra de un control no tratado para determinar si el tratamiento ha tenido el efecto de alterar el nivel de biomarcador, o una reducción o el mantenimiento del estadio de la enfermedad renal crónica o una ralentización de la progresión a través de los estadios de la enfermedad renal crónica después del tratamiento indica que el tratamiento ha sido exitoso.

La enfermedad renal crónica puede ser enfermedad renal crónica en estadio 1 o estadio 2. La enfermedad renal crónica puede ser enfermedad renal crónica en estadio 3.

La muestra puede ser orina, sangre, plasma, suero o saliva, preferiblemente la muestra puede ser plasma o suero.

- 5 La cantidad del biomarcador en la muestra se puede medir mediante la unión de un anticuerpo de captura específico para el biomarcador. La medición de biomarcadores puede incorporar un anticuerpo adicional que se etiqueta de forma detectable, preferiblemente en donde la etiqueta es peroxidasa de rábano picante.

La cantidad del biomarcador en la muestra se puede medir utilizando la tecnología de matrices y biochips.

- 10 Se prefiere que en el método de la invención se midan los niveles de MIP 1 α , IL8, IL1 β y CYSC; o se midan los niveles de VCAM1, MIP 1 α , IL8 y CYSC; o se midan los niveles de NSE, MIP 1 α , IL8 y CYSC; o se midan los niveles de NSE, VCAM1, MIP 1 α e IL8; o se midan los niveles de EGF, FABP1, IL8, sTNFR1, sTNFR2, dímero D, NGAL y MIP 1 α .

- 15 En un tercer aspecto, la invención proporciona el uso de un kit para la detección de la enfermedad renal crónica en un método según cualquiera de los aspectos que proceden de la invención, comprendiendo el kit una sonda que se une específicamente a los biomarcadores especificados.

- 20 En un cuarto aspecto, la invención proporciona un dispositivo en estado sólido que comprende un sustrato que comprende anticuerpos que se unen específicamente a MIP 1 α , IL8, IL1 β y CYSC; o VCAM1, MIP 1 α , IL8 y CYSC; o NSE, MIP 1 α , IL8 y CYSC; o NSE, VCAM1, MIP 1 α e IL8; o EGF, FABP1, IL8, sTNFR1, sTNFR2, dímero D, NGAL y MIP 1 α . Se prevé que en el dispositivo en estado sólido de la invención, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un dispositivo en estado sólido según el aspecto anterior para detectar la enfermedad renal crónica en un sujeto. Se prevé que el uso del dispositivo en estado sólido será para detectar la enfermedad renal crónica en estadio 1 o estadio 2, o la enfermedad renal crónica en estadio 3.

25 Descripción de los dibujos

La invención se describe haciendo referencia a las siguientes figuras en las que:

La Figura 1 muestra diagramas de caja que representan los niveles de C3a desArg medidos en muestras de suero tomadas de controles sanos, pacientes que padecen ERC en estadio 1 o estadio 2 y pacientes que padecen ERC en estadio 3;

- 30 La figura 2 muestra diagramas de caja que representan los niveles de MIP 1 α , medidos en muestras de suero tomadas de controles sanos, pacientes que padecen ERC en estadio 1 o estadio 2 y pacientes que padecen ERC en estadio 3;

- 35 La figura 3 muestra diagramas de caja que representan los niveles de sTNFR1 medidos en muestras de suero tomadas de controles sanos, pacientes que padecen ERC en estadio 1 o estadio 2 y pacientes que padecen ERC en estadio 3;

La figura 4 muestra diagramas de caja que representan los niveles de sTNFR2, medido en muestras de suero tomadas de controles sanos, pacientes que padecen ERC en estadio 1 o estadio 2 y pacientes que padecen ERC en estadio 3;

- 40 La Figura 5 muestra diagramas de caja que representan los niveles de IL-8 medidos en muestras de suero tomadas de controles sanos, pacientes que padecen ERC en estadio 1 o estadio 2 y pacientes que padecen ERC en estadio 3;

La Figura 6 muestra diagramas de caja que representan los niveles de EGF medidos en muestras de suero tomadas de controles sanos, pacientes que padecen ERC en estadio 1 o estadio 2 y pacientes que padecen ERC en estadio 3;

- 45 La Figura 7 muestra diagramas de caja que representan los niveles de creatinina medidos en muestras de suero tomadas de controles sanos, pacientes que padecen ERC en estadio 1 o estadio 2 y pacientes que padecen ERC en estadio 3;

- 50 La Figura 8 muestra los valores agregados de AUC obtenidos para discriminar sujetos control de pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 1, estadio 2 y estadio 3 para todas las combinaciones que incluyen cada biomarcador;

La Figura 9 muestra los valores agregados de AUC obtenidos para discriminar pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 1 o estadio 2 de sujetos control para todas las combinaciones que incluyen cada biomarcador;

La figura 10 muestra los valores agregados de AUC obtenidos para discriminar pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 3 de sujetos control para todas las combinaciones que incluyen cada biomarcador; y

5 La Figura 11 muestra los valores agregados de AUC obtenidos para la discriminación total entre los tres grupos de pacientes (control, estadio 1/2, estadio 3) para todas las combinaciones que incluyen cada biomarcador.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención proporciona un método para la detección de la enfermedad renal crónica determinando el nivel de un biomarcador seleccionado a partir de MIP 1 α en una muestra obtenida del paciente y comparando el nivel con un control. Un nivel alterado del biomarcador en la muestra en comparación con el control indica que el paciente padece o está en riesgo de desarrollar enfermedad renal.

15 El término "enfermedad renal" en el contexto de la presente invención se entiende que significa afecciones o enfermedades caracterizadas por una disminución de la función renal en comparación con pacientes sanos. La enfermedad renal puede incluir enfermedad renal crónica (ERC), insuficiencia renal aguda (IRA), nefropatía diabética, glomerulonefritis, glomerulosclerosis focal, nefropatía por complejos inmunes o nefritis lúpica. La enfermedad renal se puede causar por una lesión renal inducida por medicamentos o por el rechazo de un injerto renal. La enfermedad renal se puede caracterizar como síndrome nefrótico o insuficiencia renal.

20 La "cantidad" de un biomarcador se refiere a la cantidad, nivel de expresión o concentración del biomarcador dentro de la muestra. La cantidad de un biomarcador también se puede referir a la medición del biomarcador expresada como una proporción o porcentaje de la cantidad de uno o más analitos diferentes. La cantidad de uno o más de esos otros analitos puede permanecer constante en la mayoría de las muestras o condiciones. A modo de ejemplo, los otros analitos podrían ser albúmina, β -actina o proteínas totales de la matriz.

La cantidad de un biomarcador también se puede referir a la medición de biomarcadores expresada como una proporción o porcentaje de la cantidad de uno o más analitos, donde se propone que la cantidad de uno o más analitos tenga algún significado bioquímico para la afección clínica de interés.

25 El término "sonda" se refiere a una molécula que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana de manera que la molécula diana se puede detectar como una consecuencia de dicha unión específica. Las sondas que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos, aptámeros y oligonucleótidos.

30 El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina que reconoce específicamente un epítipo sobre una diana como se determina por las características de unión de los dominios variables de inmunoglobulina de las cadenas pesada y ligera (VHS y VLS, por sus siglas en inglés), más específicamente las regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés). En la técnica se conocen muchas formas de anticuerpos potenciales, que pueden incluir, pero no se limitan a, una pluralidad de anticuerpos monoclonales intactos o mezclas policlonales que comprenden anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos F_{ab}, F_{ab}' y F_v, anticuerpos lineales anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos que comprenden fragmentos de anticuerpos), fragmentos variables monocatenarios (scFvS), anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y proteínas de fusión que comprenden los dominios necesarios para el reconocimiento de un epítipo dado sobre una diana. Preferiblemente, las referencias a anticuerpos en el contexto de la presente invención se refieren a anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos también se pueden conjugar con varias etiquetas detectables para permitir la detección, que incluyen, pero no se limitan a, radionucleidos, fluoróforos, colorantes o enzimas que incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina.

40 El término "aptámero" se refiere a una molécula de oligonucleótido o una molécula de polipéptido que se une específicamente a una molécula diana. Los aptámeros oligonucleotídicos pueden ser ribonucleótidos (ARN) o desoxirribonucleótidos (ADN) y típicamente consisten en cadenas cortas de oligonucleótidos. Los aptámeros polipeptídicos típicamente consisten en dominios peptídicos cortos que pueden estar unidos a un extremo o a ambos extremos de un andamio proteico.

45 El término "se une específicamente", en el contexto de las interacciones anticuerpo-epítipo, se refiere a una interacción en donde el anticuerpo y el epítipo se asocian más frecuentemente o rápidamente, o con mayor duración o afinidad, o con cualquier combinación de los anteriores, que cuando cualquier anticuerpo o epítipo se sustituye por una sustancia alternativa, por ejemplo, una proteína no relacionada. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa reconocimiento específico. Además, se aprecia que un anticuerpo puede reconocer más de un antígeno específicamente. Las técnicas conocidas en la técnica para determinar la unión específica de una diana con un anticuerpo monoclonal o la ausencia de la misma incluyen, pero no se limitan a, análisis por FACS, tinción inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, transferencia Western/transferencia puntiforme, ELISA, cromatografía de afinidad. A modo de ejemplo y sin limitación, la unión específica, o la ausencia la misma, se puede determinar mediante análisis comparativo con un control que comprende el uso de un anticuerpo que es conocido en la técnica para reconocer específicamente dicha diana y/o un control que comprende la ausencia de reconocimiento específico o reconocimiento específico mínimo de dicha diana (por ejemplo, en donde el control comprende el uso de un anticuerpo no específico). Dicho análisis comparativo puede ser cualitativo o

cuantitativo. Se entiende, sin embargo, que se dice que un anticuerpo o una parte de unión que demuestra un reconocimiento específico exclusivo de una diana dada tiene una especificidad mayor para dicha diana cuando se compara con un anticuerpo que, por ejemplo, reconoce específicamente la diana y una proteína homóloga.

5 En el contexto de la presente invención, se entiende por "valor de control" el nivel de un biomarcador particular, tal como C3a desArg, IL-8, MIP 1 α , ADPN, CD26, creatinina, PCR, CYSC, dímero D, EGF, ESEL, FABP1, GMCSF, ICAM1, IFN γ , IL10, IL15, IL1 α , IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, LSEL, MCP1, MMP9, NGAL, NSE, PSEL, sIL2 α , sIL6R, STNFR1, STNFR2, TNF α , VEGF o VCAM1 típicamente encontrados en individuos sanos. El nivel de control de un biomarcador se puede determinar mediante el análisis de una muestra aislada de un individuo sano o puede ser el
10 nivel del biomarcador que el experto en la materia entiende que es típico para un individuo sano. El "valor de control" puede ser un rango de valores considerados por el experto como un nivel normal para el biomarcador en un individuo sano. El experto apreciaría que los valores de control para un biomarcador se puedan calcular por el usuario analizando el nivel del biomarcador en una muestra de un individuo sano o mediante referencia a los valores típicos proporcionados por el fabricante del análisis utilizado para determinar el nivel del biomarcador en la muestra.

15 Preferiblemente, la muestra aislada del paciente es una muestra de suero, pero también puede ser sangre, plasma, orina o saliva (particularmente con respecto a la creatinina salival). La determinación del nivel de un biomarcador se puede realizar en una o más muestras del paciente. La muestra se puede obtener del paciente mediante métodos utilizados rutinariamente en la técnica.

Los presentes autores han descubierto que la detección de niveles alterados de un biomarcador seleccionado del
20 grupo que consiste en C3a desArg, IL-8, MIP 1 α , ADPN, CD26, creatinina, PCR, CYSC, dímero D, EGF, ESEL, FABP1, GMCSF, ICAM1, IFN γ , IL10, IL15, IL1 α , IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, LSEL, MCP1, MMP9, NGAL, NSE, PSEL, sIL2 α , sIL6R, STNFR1, STNFR2, TNF α , VEGF y VCAM1 en muestras se pueden utilizar para identificar pacientes que padecen ERC o para estadificar la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar para diagnosticar ERC en fase temprana. En el contexto de la presente invención, se entiende que "fase
25 temprana" significa cualquiera de los estadios primero o segundo de ERC como se define por la clasificación KDOQI.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar pacientes que padecen ERC o estadificar la progresión de ERC en un paciente que comprende medir la cantidad de un biomarcador en una muestra obtenida del sujeto, y determinar si la cantidad del biomarcador está alterada en comparación con un
30 control normal, en donde el biomarcador es MIP 1 α . El rango de valores de control de un biomarcador puede variar dependiendo del perfil demográfico de la población y de la muestra que se ensaya. Por ejemplo, el rango de valores de control de un individuo sano puede variar de una muestra de sangre en comparación con una muestra de orina. El experto puede determinar el umbral superior e inferior para una muestra dada y el perfil demográfico del paciente analizando muestras de una cohorte de pacientes para encontrar valores promedio. Los niveles de cada
35 biomarcador medido en pacientes control y en pacientes que padecen ERC se presentan en la Tabla 1 a continuación.

La presente descripción también incluye un método para identificar pacientes en diversos estadios de ERC o estadificar la progresión de ERC que comprende medir la cantidad de dos o más biomarcadores en una o más muestras obtenidas del sujeto, y determinar si la cantidad de los biomarcadores está alterada en comparación con
40 un control normal, en donde los dos o más biomarcadores se seleccionan del grupo que consiste en C3a desArg, IL-8, MIP 1 α , ADPN, CD26, creatinina, PCR, CYSC, dímero D, EGF, ESEL, FABP1, GMCSF, ICAM1, IFN γ , IL10, IL15, IL1 α , IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, LSEL, MCP1, MMP9, NGAL, NSE, PSEL, sIL2 α , sIL6R, STNFR1, STNFR2, TNF α , VEGF y VCAM1.

La precisión de un método de diagnóstico se describe mejor por sus características de funcionamiento del receptor (ROC, por sus siglas en inglés) (Zweig, M. FI., and Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). La gráfica ROC es un curva de todos los pares de sensibilidad/especificidad resultantes de la variación continua del umbral de decisión en todo el rango de datos observados. Una curva ROC representa la superposición entre las dos distribuciones al trazar la sensibilidad frente a 1 - especificidad para el rango completo de umbrales de decisión. En el eje y está la sensibilidad, o la fracción verdadera positiva definida como [(número de resultados de ensayos verdaderos positivos)/(número de resultados de ensayos verdaderos positivos + número de resultados de ensayos falsos negativos)]. Esto también se conoce como positividad en presencia de una enfermedad o afección. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x se encuentra la fracción de falsos positivos, o 1 - especificidad [definida como (número de resultados falsos positivos)/(número de resultados verdaderos negativos + número de resultados falsos positivos)]. Es un índice de especificidad y se calcula completamente a partir del subgrupo no
55 afectado. Debido a que las fracciones de verdadero y falso positivo se calculan por separado, utilizando los resultados del ensayo de dos subgrupos diferentes, la curva ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto en la curva ROC representa un par de sensibilidad/especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con discriminación perfecta (sin solapamiento en las dos distribuciones de resultados) tiene una curva ROC que pasa por la esquina superior izquierda, donde la fracción verdadera positiva es 1,0 o 100% (sensibilidad perfecta), y la fracción falsa positiva es 0 (especificidad perfecta). La curva teórica para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados para los dos grupos) es una línea diagonal de 45° desde la esquina inferior izquierda hasta la esquina superior derecha. La mayoría de las
60

curvas caen entre estos dos extremos. Cualitativamente, cuanto más cerca esté la curva de la esquina superior izquierda, mayor será la precisión general del ensayo.

Un objetivo conveniente para cuantificar la precisión diagnóstica de una prueba de laboratorio es expresar su rendimiento en un solo número. La medida global más común es el área bajo la curva (AUC) de la curva ROC. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que la medición percibida permitirá la identificación correcta de una afección. Por convención, este área siempre es $\geq 0,5$. Los valores oscilan entre 1,0 (separación perfecta de los valores de ensayo de los dos grupos) y 0,5 (sin aparente diferencia de distribución entre los dos grupos de valores de ensayo). El área no depende solo de una porción particular de la curva, tal como el punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad al 90% de especificidad, sino en toda la curva. Esta es una expresión cuantitativa y descriptiva de cuán cerca está la curva ROC de la perfecta (área = 1,0). En el contexto de la presente invención, la Tabla 2 presenta valores de AUC para biomarcadores individuales donde los niveles alterados de los biomarcadores se utilizan para identificar pacientes que padecen ERC o para clasificar la progresión de ERC.

Cuando se utilizan dos o más biomarcadores en la invención, se puede obtener a partir de un modelo de clasificación por aprendizaje matemático o automático adecuado, tal como una ecuación de regresión logística. El experto en estadística entenderá cómo se obtiene a partir de dicho modelo adecuado, que puede incluir otras variables, como la edad y el sexo del paciente. La curva ROC se puede utilizar para evaluar la precisión del modelo, y el modelo se puede utilizar de forma independiente o en un algoritmo para ayudar en la toma de decisiones clínicas. Aunque una ecuación de regresión logística es un procedimiento matemático/estadístico común utilizado en tales casos y una opción en el contexto de la presente invención, también se pueden utilizar otros procedimientos matemáticos/estadísticos, árboles de decisión o aprendizaje automático. El experto apreciará que el modelo generado para una población determinada puede necesitar ajustarse para su aplicación a conjuntos de datos obtenidos de diferentes poblaciones o cohortes de pacientes.

Los presentes autores han encontrado además que la detección de niveles alterados de combinaciones de dos o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en C3a desArg, IL-8, MIP 1 α , ADPN, CD26, creatinina, PCR, CYSC, dímero D, EGF, ESEL, FABP1, GMCSF, ICAM1, IFN γ , IL10, IL15, IL1 α , IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, LSEL, MCP1, MMP9, NGAL, NSE, PSEL, sIL2 α , sIL6R, STNFR1, STNFR2, TNF α , VEGF y VCAM1 se pueden utilizar para identificar pacientes que padecen ERC o para estadificar la progresión de la enfermedad. La Tabla 3 presenta los valores de AUC para combinaciones de dos o más biomarcadores donde los niveles alterados de los biomarcadores se utilizan para identificar pacientes que padecen ERC o para estadificar la progresión de ERC, y donde los valores de AUC para la combinación de biomarcadores es mayor que cualquiera de los biomarcadores individuales solos.

La presente descripción también proporciona un método para respaldar la decisión de efectuar una intervención terapéutica en un paciente con sospecha de enfermedad renal que comprende medir la cantidad de un biomarcador en una muestra obtenida del sujeto, y determinar si la cantidad del biomarcador está alterada en comparación con un control normal, en donde el biomarcador se selecciona del grupo que consiste en C3a desArg, IL-8, MIP 1 α , ADPN, CD26, Creatinina, PCR, CYSC, dímero D, EGF, ESEL, FABP1, GMCSF, ICAM1, IFN γ , IL10, IL15, IL1 α , IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, LSEL, MCP1, MMP9, NGAL, NSE, PSEL, sIL2 α , sIL6R, STNFR1, STNFR2, TNF α , VEGF y VCAM1, y dependiendo de la cantidad de biomarcador medido declinar o realizar una intervención terapéutica.

La decisión de efectuar una intervención terapéutica será realizada por un médico, y dicha intervención estará diseñada para combatir la enfermedad renal. Dicha intervención terapéutica puede incluir una o más de terapia de células madre adultas, terapia de trasplante, diálisis, control de la dieta, ejercicio o terapia con medicamentos. El tratamiento farmacológico se puede seleccionar del grupo que consiste en: un diurético, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un antagonista del receptor de angiotensina II, un antagonista beta-adrenérgico, un anagonista alfa-adrenérgico, un antagonista del calcio, una estatina, eritropoyetina, vitamina D, vitamina C, vitamina B, ácido fólico, un hipouricemiante, un aglutinante de fosfato, una resina de unión de potasio, un inmunosupresor y un suplemento de calcio.

La etapa de medición del biomarcador se puede reemplazar por la medida de un complejo inmune formado al añadir a la muestra del paciente un anticuerpo capaz de unirse específicamente al biomarcador. La unión del anticuerpo al biomarcador forma un complejo inmune que luego se puede detectar y medir utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica.

La Tabla 1 presenta los niveles de cada biomarcador medidos en suero. Para evitar dudas, un nivel de expresión aumentado (cuando se compara con un control sano no enfermo) de C3a desArg, IL-8, MIP 1 α , ADPN, CD26, PCR, CYSC, dímero D, EGF, ESEL, FABP1, ICAM1, IL10, IL1 β , IL5, IL6, MCP1, MMP9, NGAL, PSEL, sIL2 α , STNFR1, STNFR2, TNF α , VEGF o VCAM1 indican la presencia o el riesgo de enfermedad renal crónica en estadio 1 o estadio 2. Un nivel de expresión aumentado (cuando se compara con un control sano no enfermo o un paciente con enfermedad renal crónica en estadio 1 o estadio 2) de C3a desArg, IL-8, MIP 1 α , ADPN, CD26, creatinina, PCR, CYSC, dímero D, EGF, ESEL, FABP1, GMCSF, ICAM1, IL10, IL15, IL1 β , IL5, IL6, MCP1, MMP9, NGAL, PSEL, sIL2 α , STNFR1, STNFR2, TNF α , VEGF o VCAM1 indican la presencia o el riesgo de enfermedad renal crónica en estadio 3. Un nivel de expresión reducido (en comparación con un control sano no enfermo) de creatinina, IL4, LSEL o NSE indica la presencia o el riesgo de enfermedad renal crónica en estadio 1 o estadio 2. Un nivel de expresión

reducido (en comparación con un control sano no enfermo o un paciente con enfermedad renal crónica en estadio 1 o estadio 2) de IL1 α , IL4 o NSE indica la presencia o el riesgo de enfermedad renal crónica en estadio 3.

5 La Tabla 2 presenta valores de AUC para biomarcadores individuales donde los niveles alterados de los biomarcadores se utilizan para identificar pacientes que padecen ERC o para clasificar la progresión de ERC. Los datos indican valores de AUC para el uso de biomarcadores individuales para discriminar entre sujetos control sanos y pacientes con enfermedad renal crónica (control frente a ERC), entre sujetos control sanos y pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 1 o estadio 2 (control frente a estadio 1/2), entre sujetos control sanos y
10 pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 3 (control frente a estadio 3) y entre sujetos control sanos, pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 1 o estadio 2 y pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 3 (total).

15 La Tabla 3 presenta valores de AUC para combinaciones de dos o más biomarcadores donde los niveles alterados de los biomarcadores se utilizan para identificar pacientes que padecen ERC o para estadificar la progresión de ERC. Los datos indican valores de AUC para combinaciones de biomarcadores utilizados para discriminar entre sujetos control sanos y pacientes con enfermedad renal crónica (control frente a ERC), entre sujetos control sanos y pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 1 o estadio 2 (control frente a estadio 1/2), entre sujetos control sanos y pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 3 (control frente a estadio 3) y entre sujetos control sanos, pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 1 o estadio 2 y pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 3 (total).

Tabla 1

Compendio de los niveles de biomarcadores medidos en suero

Marcador	Unidades	Control			Estadio 1/2				Estadio 3				
		N	Mediana	5-95%	N	Mediana	5-95%	p vs Control	N	Mediana	5-95%	p vs Control	p vs estadio 1/2
C3adesArg	ng/ml	51	4458,62	1308,8-9540	89	16525,61	6376,3-33913,2	<0,0001	44	19279,24	4539,5 – 43390	<0,0001	1,0000
CD26	ng/ml	51	821,84	466,12-1349,6	89	996,31	495,7 – 2064,2	0,0517	44	895,60	323,05-1765,9	1,0000	0,5324
Creatinina	μmol/l	64	87,47	64,38-115,26	89	82,66	59-108,29	0,1219	44	137,87	80,5 – 254,91	<0,0001	<0,0001
PCR	mg/LI	163	2,75	0,51 – 13,69	294	4,61	0,59 – 15,5	<0,0001	104	4,88	0,67- 14,01	<0,0001	0,9459
DDMER	ng/ml	163	42,03	9,56 – 97,46	295	97,03	16,42-277,11	<0,0001	105	141,95	22,52-498,59	<0,0001	0,0021
NSE	ng/ml	163	4,94	1,89-10,65	295	2,95	0,8 – 6,27	<0,0001	105	2,94	0,56-9,43	<0,0001	0,2150
NGAL	ng/ml	163	650,34	295,13 – 1089,4	295	721,52	284,09 – 1373,14	0,4302	105	1093,78	396,41 – 1843,17	<0,0001	<0,0001
VCAM1	ng/ml	211	561,35	355,34-851,02	273	689,46	416,89-1050,88	<0,0001	105	825,37	456,68-1507,6	<0,0001	0,0002
ICAM1	ng/ml	211	264,35	171,23-381,46	273	316,55	189,78-497,49	<0,0001	105	341,22	175,73 – 645,56	<0,0001	0,3170
ESEL	ng/ml	211	17,02	7,61 – 31,26	273	21,72	8,14-46,83	<0,0001	105	19,73	8,05- 37,33	0,0174	0,7830
PSEL	ng/ml	211	165,89	96,74 – 239,44	273	213,30	113,09-322,73	<0,0001	105	207,42	117,7- 330,97	<0,0001	1,0000
LSEL	ng/ml	211	1696,57	1032,23-2677,06	273	1660,49	978,47 – 2562,48	0,6135	105	1695,86	1023,12 – 2810,2	0,0798	0,6309
IL5	pg/ml	50	1,48	0,48 – 4,54	98	1,84	0,47-4,85	1,0000	52	1,88	0,62-8,35	1,0000	1,0000
IL15	pg/ml	50	1,09	0,43-1,87	102	1,02	0,53-1,67	0,9433	52	1,30	0,52-3,91	1,0000	0,3000
GMCSF	pg/ml	50	1,01	0-1,89	102	1,01	0-2,87	0,2554	52	1,24	0-6,12	0,9645	1,0000
MIP1A	pg/ml	50	5,41	3,02-8,23	102	11,60	2,89 – 29,54	<0,0001	52	15,59	4,01 – 34,34	<0,0001	0,1575
sIL2a	ng/ml	163	0,17	0,08 – 0,26	295	0,20	0,08-0,38	0,0743	105	0,26	0,07-0,5	<0,0001	0,0002

Tabla 1 (continuación)

Compendio de los niveles de biomarcadores medidos en suero

Marcador	Unidades	Control			Estadio 1/2			Estadio 3					
		N	Mediana	5-95%	N	Mediana	5-95%	p vs Control	N	Mediana	5-95%	p vs Control	p vs estadio 1/2
SIL6R	ng/ml	163	1,78	0,68-3,15	295	1,72	0,54 – 3,28	0,8181	105	2,07	0,89 – 3,93	0,0854	0,0015
STNFR1	ng/ml	163	0,44	0,23-0,65	295	0,68	0,36-1,16	<0,0001	105	1,27	0,59-2,69	<0,0001	<0,0001
STNFR2	ng/ml	163	0,34	0,11 – 0,67	295	0,76	0,24-1,57	<0,0001	105	1,58	0,28-3,71	<0,0001	<0,0001
MMP9	ng/ml	163	185,88	39,34 – 392,04	295	341,22	76,77 – 725,82	<0,0001	105	320,99	54,05 – 734,84	<0,0001	1,0000
IL2	pg/ml	164	3,03	0-6,3	295	3,00	0 – 9,05	1,0000	105	3,06	0 – 6,02	0,3807	1,0000
IL4	pg/ml	164	3,03	1,48-5,36	295	2,64	1,79-3,99	1,0000	105	2,53	1,66-3,95	0,3568	0,0210
IL6	pg/ml	164	2,30	0,64-5,21	295	8,08	0,87- 11,08	<0,0001	105	8,93	1,3-21,38	<0,0001	<0,0001
IL8	pg/ml	164	10,63	4,4 – 20,83	295	111,42	9,04- 510,1	<0,0001	105	108,26	11,96- 650,72	<0,0001	1,0000
IL10	pg/ml	164	1,12	0 – 2,54	295	3,30	0-3,33	0,2737	105	1,51	0 – 3,62	0,2761	1,0000
VEGF	pg/ml	164	113,55	15,82- 266,05	295	136,23	31,04- 319,48	0,0005	105	122,89	37,53- 271,83	0,0245	1,0000
IFNG	pg/ml	164	0,57	0,26-1,32	295	0,58	0-1,25	0,4417	105	0,57	0-1,9	1,0000	1,0000
TNFA	pg/ml	164	2,42	1,43-3,41	295	2,64	1,43-4,26	0,2495	105	3,47	1,98-5,28	<0,0001	<0,0001
IL1A	pg/ml	164	0,45	0,04 – 0,56	295	0,46	0,13-0,95	1,0000	105	0,31	0-0,73	1,0000	0,8398
IL1B	pg/ml	164	1,54	0-4,37	295	2,27	0-4,89	0,0004	105	1,87	0-3,9	0,2326	0,3362
MCP1	pg/ml	164	234,97	80,93- 440,1	295	259,55	101,42- 533,3	0,3432	105	276,85	112,64- 528,43	0,0178	0,2368
EGF	pg/ml	164	53,39	2,84- 115,55	295	147,39	27,7 – 327,5	<0,0001	105	139,33	27,92- 281,65	<0,0001	1,0000
ADPN	ng/ml	89	4372,6 2	812- 11022	134	4949,61	955 - 13746	1,0000	24	9472,29	1603,67- 43539,5	0,0037	0,0070
CYSC	ng/ml	89	335,02	54 – 707	134	574,74	151,43- 1337,3	<0,0001	24	1244,60	467,25 – 4081,62	<0,0001	<0,0001
FABP1	ng/ml	140	11,55	2,20- 27,67	112	33,20	2,07- 116,7	0,0005	44	80,53	4,53- 322,65	0,0001	0,0061

Tabla 2

Valores de AUC calculados para niveles alterados de biomarcadores individuales en el diagnóstico y la estadificación de ERC				
Biomarcador	Control vs ERC	Control vs Estadio 1/2	Control vs Estadio 3	Total
C3aDA	0,96	0,976	0,932	0,817
CD26	0,583	0,634	0,496	0,585
Creatinine	0,613	0,57	0,926	0,81
CRP	0,643	0,622	0,701	0,636
DDMER	0,763	0,738	0,828	0,734
NSE	0,725	0,715	0,752	0,682
NGAL	0,636	0,56	0,839	0,726
VCAM1	0,697	0,659	0,788	0,697
ICAM1	0,664	0,645	0,711	0,65
ESEL	0,595	0,602	0,578	0,568
PSEL	0,694	0,697	0,687	0,628
LSEL	0,583	0,58	0,588	0,556
IL5	0,497	0,496	0,499	0,497
IL15	0,508	0,553	0,633	0,631
GMCSF	0,532	0,578	0,562	0,588
MIP1A	0,86	0,836	0,91	0,802
sIL2a	0,59	0,53	0,749	0,657
sIL6R	0,521	0,544	0,541	0,559
STNFR1	0,863	0,815	0,989	0,886
STNFR2	0,866	0,841	0,931	0,843
MMP9	0,747	0,745	0,752	0,674
IL2	0,495	0,498	0,486	0,491
IL4	0,488	0,474	0,526	0,52
IL6	0,765	0,731	0,853	0,747
IL8	0,929	0,925	0,939	0,79
IL10	0,589	0,57	0,637	0,586
VEGF	0,596	0,594	0,602	0,565
IFNG	0,533	0,539	0,515	0,526
TNFA	0,605	0,534	0,793	0,685
IL1A	0,479	0,487	0,458	0,488
IL1B	0,631	0,626	0,645	0,587

Valores de AUC calculados para niveles alterados de biomarcadores individuales en el diagnóstico y la estadificación de ERC				
Biomarcador	Control vs ERC	Control vs Estadio 1/2	Control vs Estadio 3	Total
MCP1	0,571	0,563	0,593	0,564
EGF	0,868	0,87	0,865	0,742
ADPN	0,52	0,547	0,647	0,621
CYSC	0,727	0,691	0,947	0,827
FABP1	0,655	0,624	0,734	/

Tabla 3

.Valores de AUC calculados para niveles alterados de combinaciones de dos o más biomarcadores en el diagnóstico y la estadificación de ERC					
	Control vs ERC	Control vs Estadio 1/2	Control vs Estadio 3	Total	Número
C3aDA, CYSC, PCR	0,985	0,979	1	0,859	106
C3aDA,GMCSF	0,992	0,992	0,992	0,84	108
C3aDA,IL5	0,992	0,991	0,995	0,84	104
C3aDA,MIP1A	0,998	1	0,995	0,833	108
C3aDA,GMCSF,CYSC	1	1	1	0,884	97
C3aDA,PSEL,GMCSF	1	1	1	0,878	108
C3aDA,PSEL,IL5	0,988	0,985	0,995	0,906	104
C3aDA,MIP1 A,CYSC	1	1	1	0,873	97
C3aDA,GMCSF,IL6	0,994	0,995	0,992	0,89	108
C3aDA,ESEL,MIP1A	1	1	1	0,865	108
C3aDA,GMCSF,IL4	0,995	0,995	0,995	0,879	108
C3aDA, Creatinine, IL2	0,994	0,991	1	0,877	159
C3aDA,NGAL,PSEL,IL5	0,999	1	0,997	0,912	104
C3aDA,NGAL,PSEL,GMCSF	1	1	1	0,899	108
C3aDA,GMCSF,MIP1 A,CYSC	1	1	1	0,897	97
C3aDA,IL5,IFNG,CYSC	1	1	1	0,892	93
C3aDA,DDMER,IL5,CYSC	1	1	1	0,891	93
C3aDA,NGAL,PSEL,IL15	0,993	0,992	0,995	0,911	108
C3aDA,MIP1 A,TNFA,CYSC	1	1	1	0,889	97
C3aDA,ICAM1,IL5,IL1A	0,987	0,981	1	0,921	104
MIP1A, IL8,IL1B,CYSC	0,995	0,994	1	0,89	121
VCAM1,IL15,IL8,CYSC	1	1	1	0,862	121
VCAM1,MIP1A,IL8,CYSC	1	1	1	0,861	121
NSE,MIP1A,IL8,CYSC	1	1	1	0,807	121
NSE,VCAM1,MIP1A,IL8	0,999	1	0,999	0,87	191
FABP1, IL8, MIP1A, DDMER	0,985	0,978	1	0,831	114
FABP1 ,IL8,MIP1A,NGAL	0,991	0,986	1	0,822	114
FABP1 ,IL8,MIP1A,EGF	0,977	0,969	0,996	0,818	114

La estratificación de pacientes en uno de los estadios de ERC es útil para evaluar si un paciente se beneficiaría de un tipo de tratamiento en comparación con otro y también para monitorizar si un tratamiento es exitoso. La estratificación de pacientes también ayuda a determinar el pronóstico del paciente, lo que permite los requisitos de atención en el futuro.

Los métodos de la presente invención pueden utilizar métodos para determinar el nivel de IL-8, MIP 1α, CYSC, dímero D, EGF, FABP1, IL1β, NGAL, NSE, STNFR1, STNFR2 o VCAM1 conocidos en la técnica, tales como métodos basados en la determinación de proteínas enzimáticas y/o químicas o análisis inmunológicos. Los análisis inmunológicos para determinar el nivel de IL-8, MIP 1α, CYSC, dímero D, EGF, FABP1, IL1β, NGAL, NSE, STNFR1, STNFR2 o VCAM1 se pueden realizar en una variedad de formatos de ensayo, que incluyen ensayos tipo sándwich, p. ej. (ELISA), ensayos de competición (RIA competitivo), inmunoensayos de puente, inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés) e inmunocitoquímica (ICC, por sus siglas en inglés). Los métodos para determinar el nivel de IL-8, MIP 1α, CYSC, dímero D, EGF, FABP1, IL1β, NGAL, NSE, STNFR1, STNFR2 o VCAM1 incluyen el contacto de una muestra de paciente con anticuerpos que se unen a IL-8, MIP 1α, CYSC, dímero D, EGF, FABP1, IL1β, NGAL, NSE, STNFR1, STNFR2 o VCAM1 y la detección de la unión. Los anticuerpos que tienen especificidad por IL-8, MIP 1α, CYSC, dímero D, EGF, FABP1, IL1β, NGAL, NSE, STNFR1, STNFR2 o VCAM1 se pueden inmovilizar en un material de soporte utilizando métodos convencionales. La unión de IL-8, MIP 1α, CYSC, dímero D, EGF, FABP1, IL1β, NGAL, NSE, STNFR1, STNFR2 o VCAM1 a los anticuerpos en el soporte se puede detectar utilizando anticuerpos adicionales que tengan especificidad o reactividad (que pueden ser para el biomarcador u otro analito discriminante) para IL-8, MIP 1α, CYSC, dímero D, EGF, FABP1, IL1β, NGAL, NSE, STNFR1, STNFR2 o VCAM1 o utilizando métodos físicos tal como la resonancia de plasmones superficiales (Biacore Int, Suecia).

Preferiblemente, se puede utilizar un dispositivo en estado sólido para determinar el nivel de biomarcadores seleccionados de los grupos que consisten en MIP 1α, IL8, IL1β y CYSC; o VCAM1, MIP 1α, IL8 y CYSC; o NSE, MIP 1α, IL8 y CYSC; o NSE, VCAM1, MIP 1α e IL8; o EGF, FABP1, IL8, sTNFR1, sTNFR2, dímero D, NGAL y MIP 1α en la muestra aislada del paciente. El dispositivo en estado sólido comprende un sustrato que tiene una superficie activada sobre la cual se aplican los anticuerpos a MIP 1α, IL8, IL1β y CYSC; o VCAM1, MIP 1α, IL8 y CYSC; o NSE, MIP 1α, IL8 y CYSC; o NSE, VCAM1, MIP 1α e IL8; o EGF, FABP1, IL8, sTNFR1, sTNFR2, dímero D, NGAL y MIP 1α a áreas discretas de la superficie activada. Preferiblemente, el dispositivo en estado sólido puede realizar análisis de múltiples analitos tales que el nivel de MIP 1α, IL8, IL1β y CYSC; o VCAM1, MIP 1α, IL8 y CYSC; o NSE, MIP 1α, IL8 y CYSC; o NSE, VCAM1, MIP 1α e IL8; o EGF, FABP1, IL8, sTNFR1, sTNFR2, dímero D, NGAL y MIP 1α en una muestra aislada del paciente se puede determinar simultáneamente con el nivel de cualquier otro de C3a desArg, IL-8, MIP 1α, ADPN, CD26, creatinina, PCR, CYSC, dímero D, EGF, ESEL, FABP1, GMCSF, ICAM1, IFNγ, IL10, IL15, IL1α, IL1β, IL2, IL4, IL5, IL6, LFABP, LSEL, MCP1, MMP9, NGAL, NSE, PSEL, sIL2α, SIL6R, STNFR1, STNFR2, TNFα, VEGF o VCAM1 en la muestra. En esta realización, el dispositivo en estado sólido tiene una multiplicidad de sitios de reacción discretos que llevan cada uno un anticuerpo deseado unido covalentemente al sustrato, y en el que la superficie del sustrato entre los sitios de reacción es inerte con respecto al biomarcador diana. El dispositivo multianalito en estado sólido utilizado en la presente invención puede por lo tanto exhibir poca o ninguna unión no específica.

Un dispositivo que se puede utilizar en la invención se puede preparar activando la superficie de un sustrato adecuado y aplicando una matriz de anticuerpos en sitios discretos sobre la superficie. Los sustratos adecuados se producen a partir de cualquier material inerte tal como plásticos, cerámicas o vidrio. Si se desea, las otras áreas activas pueden estar bloqueadas. Los ligandos se pueden unir al sustrato a través de un conector, p. ej. mediante unión covalente. En particular, se prefiere que la superficie activada se haga reaccionar sucesivamente con un organosilano, un conector bifuncional y el anticuerpo. El dispositivo en estado sólido utilizado en los métodos de la presente invención se puede fabricar según el método descrito en, por ejemplo, GB-A-2324866. Preferiblemente, el dispositivo en estado sólido utilizado en los métodos de la presente invención es un biochip que forma parte del sistema de tecnología de matrices y biochips (BAT, por sus siglas en inglés) (disponible en Randox Laboratories Limited).

El dispositivo en estado sólido utilizado en el método de la presente invención comprende anticuerpos contra MIP 1α, IL8, IL1β y CYSC; o VCAM1, MIP 1α, IL8 y CYSC; o NSE, MIP 1α, IL8 y CYSC; o NSE, VCAM1, MIP 1α e IL8; o EGF, FABP1, IL8, sTNFR1, sTNFR2, dímero D, NGAL y MIP 1α. Preferiblemente, los anticuerpos son específicos para los marcadores indicados y exhiben una reactividad cruzada de menos de 0,5%, preferiblemente menos de 0,1%, para otros antígenos. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. El dispositivo en estado sólido utilizado en el método de la presente invención se puede procesar empleando analizadores de BAT de Randox.

La presente invención proporciona además análisis para medir la cantidad de biomarcadores en una muestra obtenida del sujeto, en donde los biomarcadores se seleccionan de los grupos que consisten en MIP 1α, IL8, IL1β y CYSC; o VCAM1, MIP 1α, IL8 y CYSC; o NSE, MIP 1α, IL8 y CYSC; o NSE, VCAM1, MIP 1α e IL8; o EGF, FABP1, IL8, sTNFR1, sTNFR2, dímero D, NGAL y MIP 1α. Los análisis de la invención se pueden utilizar para medir los niveles de combinaciones de tres, cuatro, cinco, seis, siete o más de estos biomarcadores en una muestra. Tales análisis se pueden llevar a cabo utilizando los dispositivos de estado sólido de la invención, y se pueden utilizar en los métodos de la invención.

Los métodos de la presente invención se pueden utilizar para monitorizar a un paciente postoperatorio para evaluar el riesgo de que desarrolle complicaciones renales. Específicamente, se puede obtener una muestra de un paciente a intervalos dados postoperatorios y el nivel de uno cualquiera o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en MIP 1α, IL8, IL1β y CYSC; o VCAM1, MIP 1α, IL8 y CYSC; o NSE, MIP 1α, IL8 y CYSC; o NSE, VCAM1, MIP 1α e IL8; o EGF, FABP1, IL8, sTNFR1, sTNFR2, dímero D, NGAL y MIP 1α en la muestra determinada. Una

evaluación del nivel de uno cualquiera o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en MIP 1 α , IL8, IL1 β y CYSC; o VCAM1, MIP 1 α , IL8 y CYSC; o NSE, MIP 1 α , IL8 y CYSC; o NSE, VCAM1, MIP 1 α e IL8; o EGF, FABP1, IL8, sTNFR1, sTNFR2, dímero D, NGAL y MIP 1 α durante un periodo particular, le proporciona al especialista una indicación de si el paciente está padeciendo ERC en fase temprana y se puede tomar la intervención médica en consecuencia.

Ejemplo

Se tomaron muestras de suero de 376 pacientes que padecían enfermedad renal crónica y 211 controles sanos por medio de punción venosa en un método conocido en la técnica y se almacenaron a -80°C hasta que estuvieron listas para su uso. La ERC de los pacientes se estadificó utilizando las guías KDOQI, y los pacientes que padecían ERC en estadio 1 y estadio 2 se combinaron para el propósito de este análisis como representativos de la enfermedad renal temprana que no se determina fácilmente mediante métodos convencionales basados en biomarcadores.

La muestra se compone de:

- 587 muestras de suero en total
- 271 pacientes con ERC en estadio 1/2
- 105 pacientes con ERC en estadio 3
- 211 controles de donantes

Para determinar los niveles de biomarcadores en la muestra, se emplearon inmunoensayos que utilizan la tecnología de matrices y biochips (BAT), con la excepción de la medición de creatinina. La creatinina se midió utilizando un análisis químico clínico comercialmente disponible (número de producto CR3814, Randox Laboratories), y las muestras se analizaron en el RX Daytona (disponible en Randox Laboratories).

Descripción del protocolo

Los datos se dieron a conocer en las unidades respectivas del análisis y no se utilizaron técnicas de normalización antes del análisis. Los datos se analizaron primero a través de ensayos convencionales no paramétricos univariantes. La Tabla 1 da a conocer la mediana y el percentil de 5 a 95 de cada analito estudiado. La significancia se determinó utilizando mann-whitney con corrección de bonferroni para comparaciones múltiples (control frente a estadio 1/2, control frente a estadio 3, estadio 1/2 frente a estadio 3). El análisis de las características de funcionamiento del receptor (ROC) también se realizó sobre estos datos y el área bajo la curva determinada para la identificación de; todos los pacientes con ERC (estadio 1/2/3) frente a controles sanos, estadio 1/2 frente a controles sanos, estadio 3 frente a controles sanos y para diferenciar entre los controles sanos, estadio 1/2 y estadio 3 (total). Estos valores AUC se representan en la tabla 2.

Con el fin de determinar si las posibles combinaciones de marcadores pueden haber mejorado el rendimiento de diagnóstico y estratificación, se emplearon dos métodos. El primero fue el uso de la regresión logística, donde se utilizó un subconjunto de la cohorte para desarrollar un modelo para distinguir a los pacientes con ERC de los controles sanos. La entrada hacia atrás se utilizó para seleccionar las variables óptimas requeridas. Este modelo se validó después en un subconjunto de validación, la probabilidad pronosticada de ERC se calculó utilizando la ecuación de regresión logística y después se realizó el análisis ROC.

El segundo método se llevó a cabo para examinar completamente el valor de combinar estos biomarcadores para mejorar el rendimiento diagnóstico y la estratificación de la enfermedad, se cultivaron bosques aleatorios utilizando un subconjunto seleccionado aleatoriamente de los datos para todas las posibles combinaciones de biomarcadores simples, dobles, triples y cuádruples. En total, se generaron 66.675 modelos y el AUC se calculó a partir de un subconjunto de validación por separado. Se agregaron los AUC para todas las combinaciones que contienen cada valor y los marcadores cuyo AUC promedio agregado fueron los más altos se consideraron como los marcadores más importantes. En este, C3a desArg mostró tener el mejor rendimiento en casi cualquier combinación y estuvo presente en el 78% de los modelos de mayor rendimiento. La Tabla 3 representa los AUC de algunas combinaciones para discriminar la ERC y diferenciar el estadio de la enfermedad.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la enfermedad renal crónica en un sujeto, que comprende medir la cantidad de un biomarcador en una muestra obtenida del sujeto, y determinar si la cantidad del biomarcador está alterada en comparación con un control normal, en donde el biomarcador es MIP 1 α .
2. Un método para determinar la eficacia de un tratamiento para la enfermedad renal crónica, que comprende medir la cantidad de biomarcadores seleccionados en una muestra obtenida de un sujeto que recibe dicho tratamiento, en donde los biomarcadores son MIP 1 α , IL8, IL1 β y CYSC; o VCAM1, MIP 1 α , IL8 y CYSC; o NSE, MIP 1 α , IL8 y CYSC; o NSE, VCAM1, MIP 1 α e IL8; o EGF, FABP1, IL8, sTNFR1, sTNFR2, dímero D, NGAL y MIP 1 α , y comparar el nivel de los biomarcadores con el de una muestra de un control no tratado para determinar si el tratamiento ha tenido el efecto de alterar el nivel de biomarcador, o una reducción o mantenimiento en el estadio de la enfermedad renal crónica o una ralentización de la progresión a través de los estadios de la enfermedad renal crónica después del tratamiento indica que el tratamiento ha sido exitoso.
3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en donde la enfermedad renal crónica es la enfermedad renal crónica en estadio 1 o estadio 2.
4. Un método según la reivindicación 1 o 2, en donde la enfermedad renal crónica es la enfermedad renal crónica en estadio 3.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la muestra es orina, sangre, plasma, suero o saliva, preferiblemente en donde la muestra es plasma o suero.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la cantidad del biomarcador en la muestra se mide mediante la unión de un anticuerpo de captura específico para el biomarcador.
7. Un método según la reivindicación 6, en donde la medición del biomarcador incorpora un anticuerpo adicional que se etiqueta de forma detectable, preferiblemente en donde la etiqueta es peroxidasa de rábano picante.
8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la cantidad del biomarcador en la muestra se mide utilizando tecnología de matrices y biochips.
9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 8, en donde se miden los niveles de MIP 1 α , IL8, IL1 β y CYSC; o en donde se miden los niveles de VCAM1, MIP 1 α , IL8 y CYSC; o en donde se miden los niveles de NSE, MIP 1 α , IL8 y CYSC; o en donde se miden los niveles de NSE, VCAM1, MIP 1 α e IL8; o en donde se miden los niveles de EGF, FABP1, IL8, sTNFR1, sTNFR2, dímero D, NGAL y MIP 1 α .
10. Uso de un kit para la detección de la enfermedad renal crónica en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo el kit una sonda que se une específicamente a dicho biomarcador.
11. Un dispositivo en estado sólido que comprende un sustrato que comprende anticuerpos que se unen específicamente a MIP 1 α , IL8, IL1 β y CYSC; o VCAM1, MIP 1 α , IL8 y CYSC; o NSE, MIP 1 α , IL8 y CYSC; o NSE, VCAM1, MIP 1 α e IL8; o EGF, FABP1, IL8, sTNFR1, sTNFR2, dímero D, NGAL y MIP 1 α .
12. Un dispositivo en estado sólido según la reivindicación 11, en donde los anticuerpos son anticuerpos monoclonales.
13. El uso de un dispositivo en estado sólido según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, para detectar enfermedad renal crónica en un sujeto.
14. Uso de un dispositivo en estado sólido según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, para detectar la enfermedad renal crónica en estadio 1 o estadio 2, o enfermedad renal crónica en estadio 3.

Figura 1

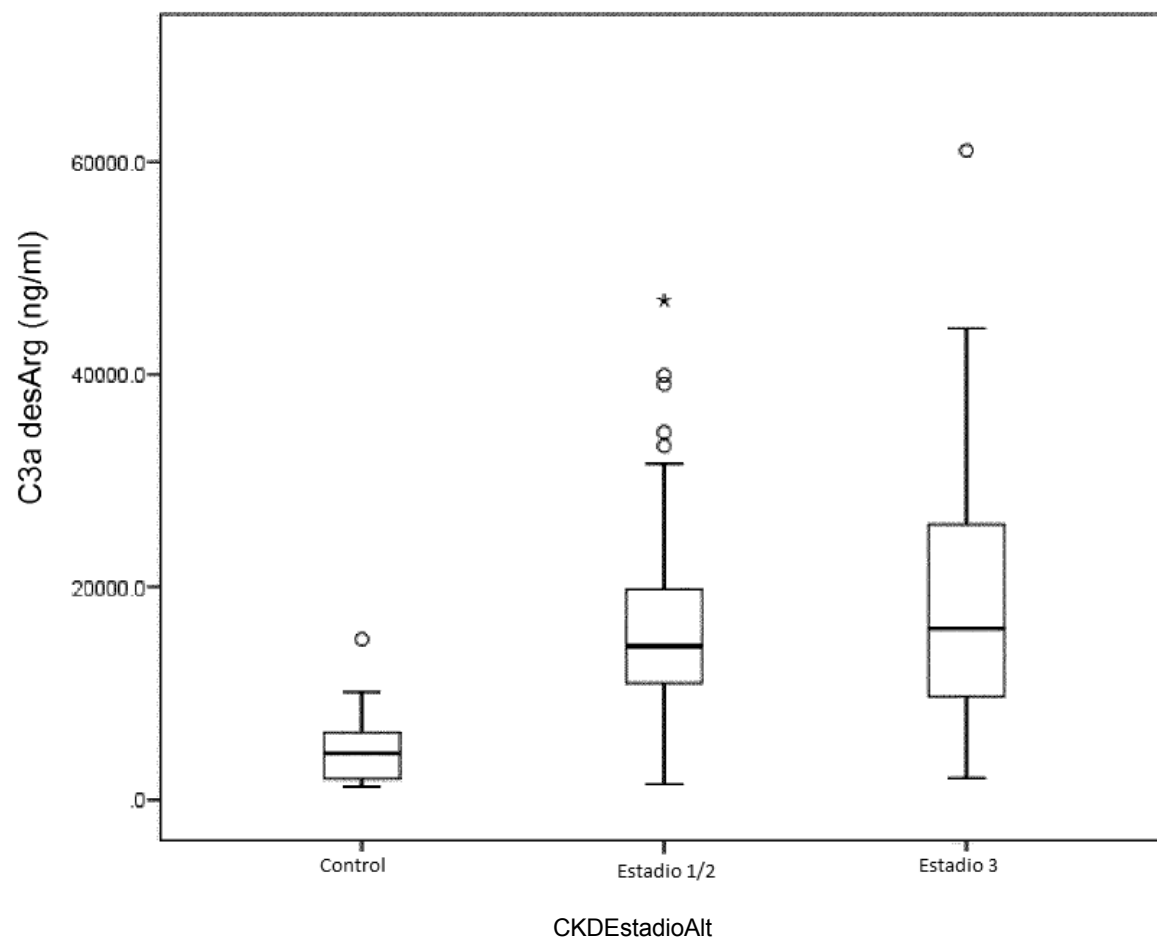


Figura 2

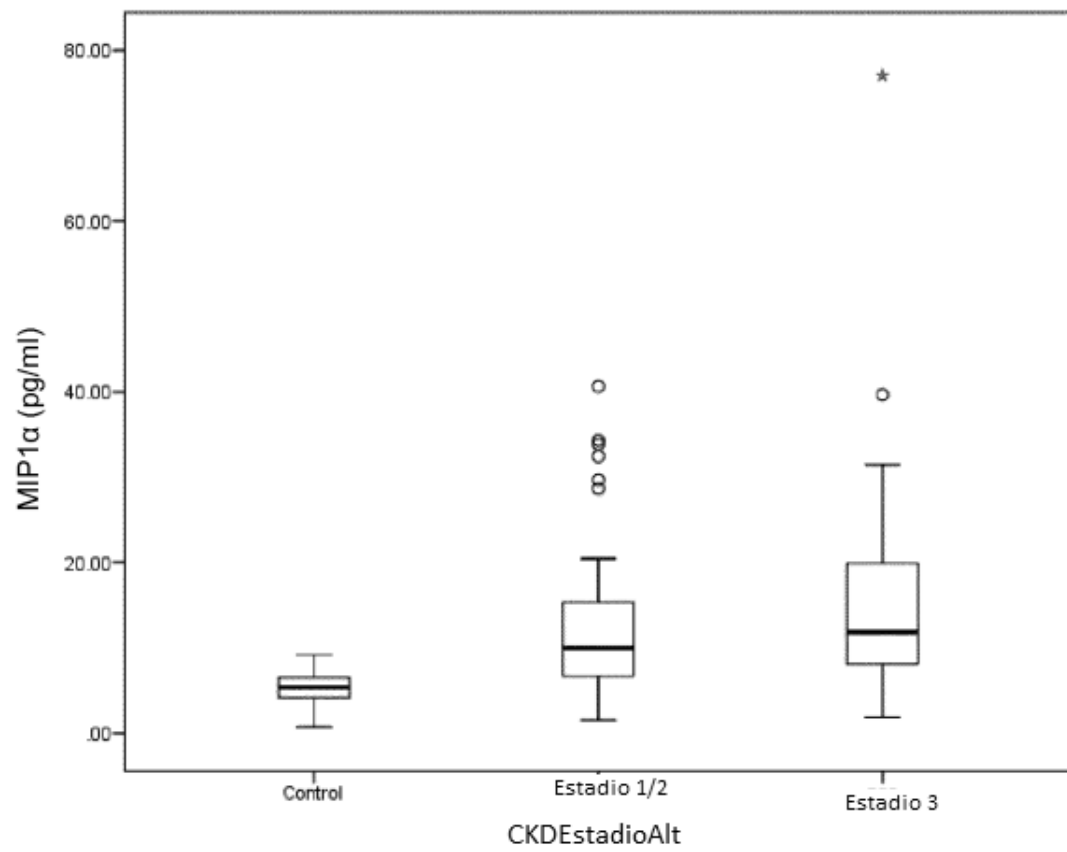


Figura 3

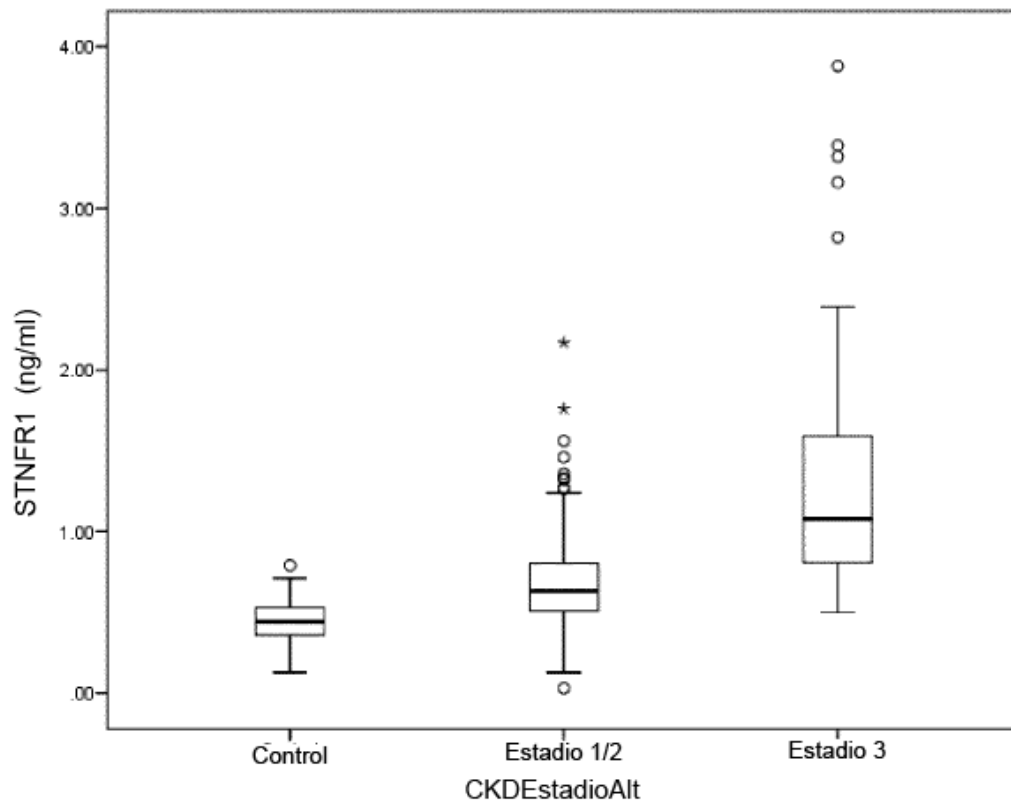


Figura 4

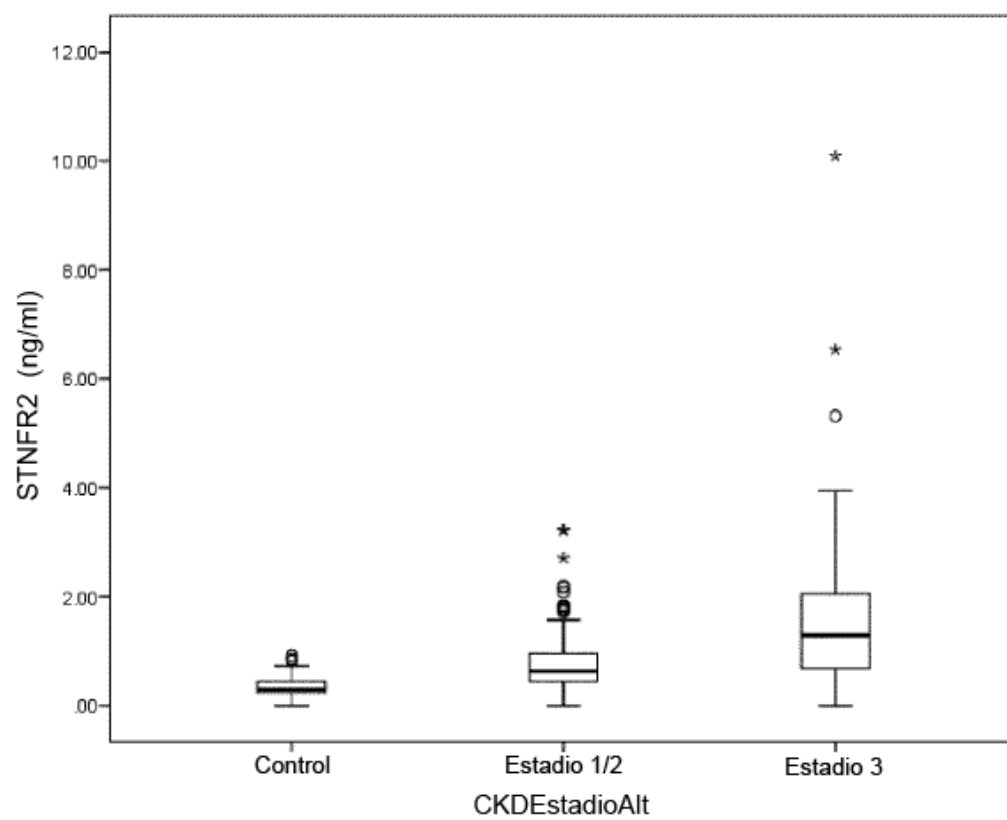


Figura 5

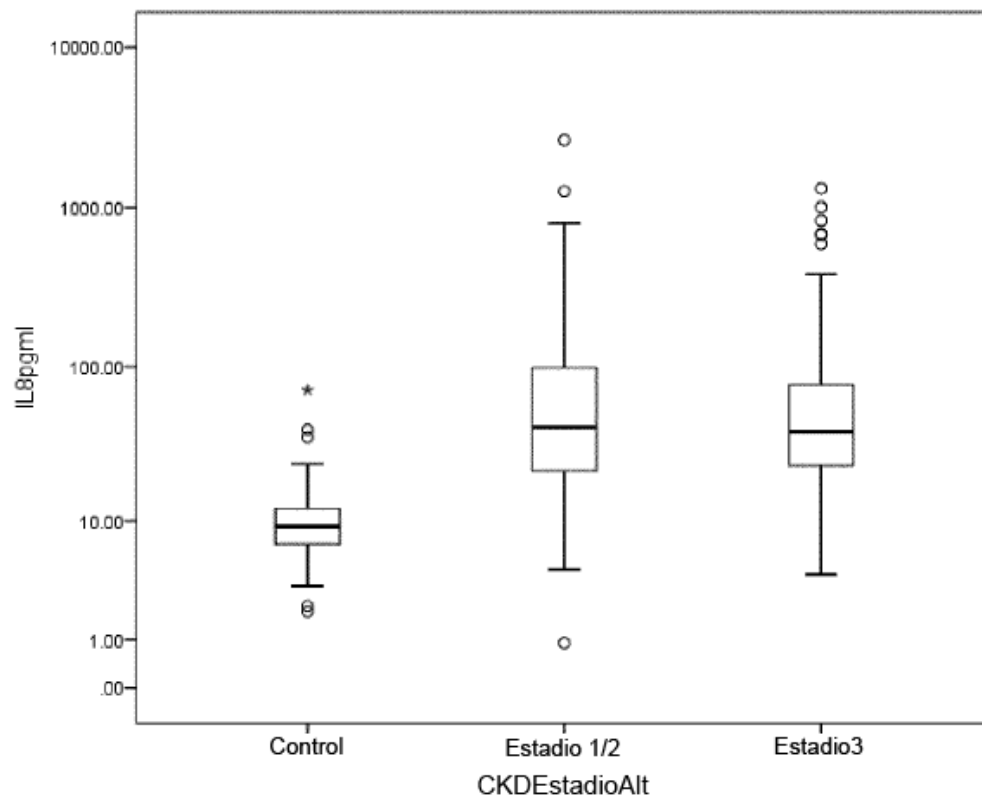


Figura 6

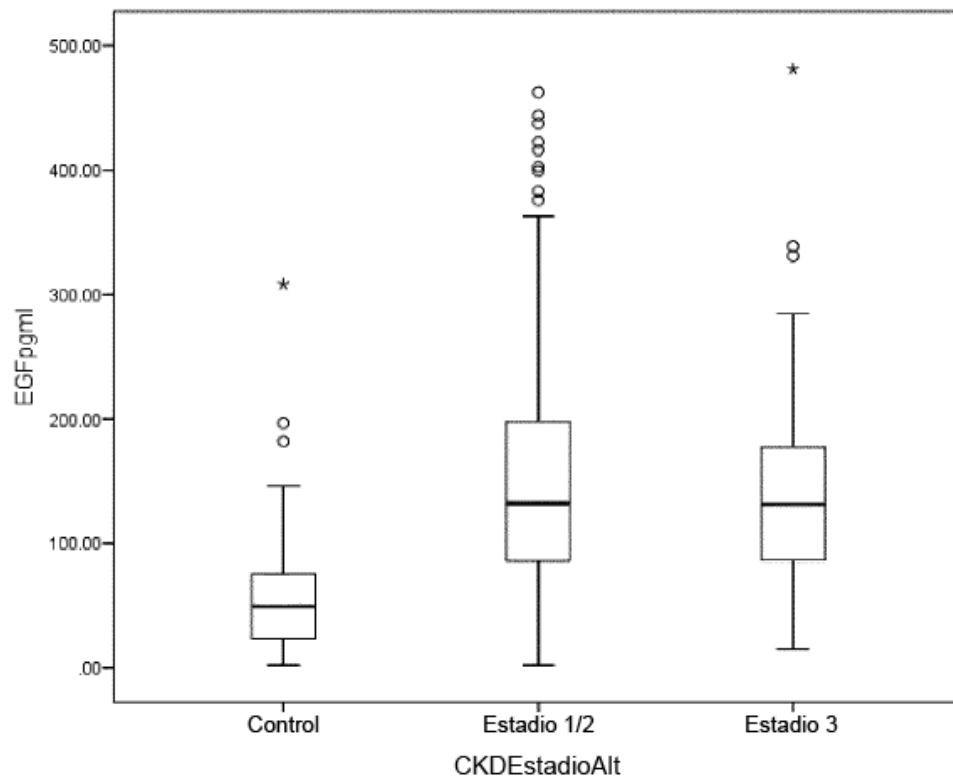


Figura 7

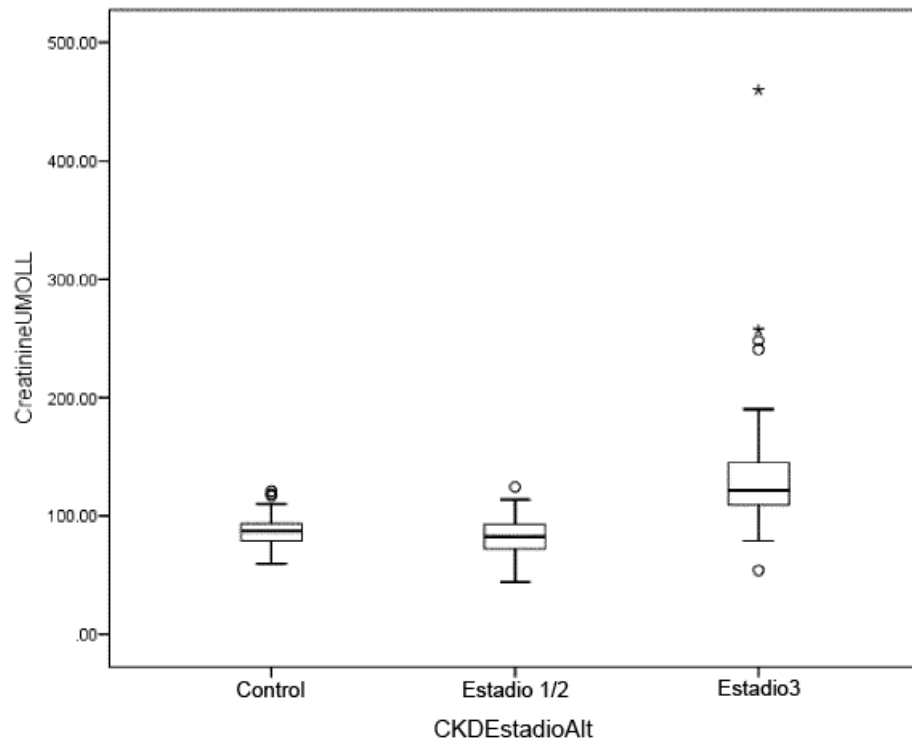


Figura 8

AUC para combinaciones que contienen cada factor

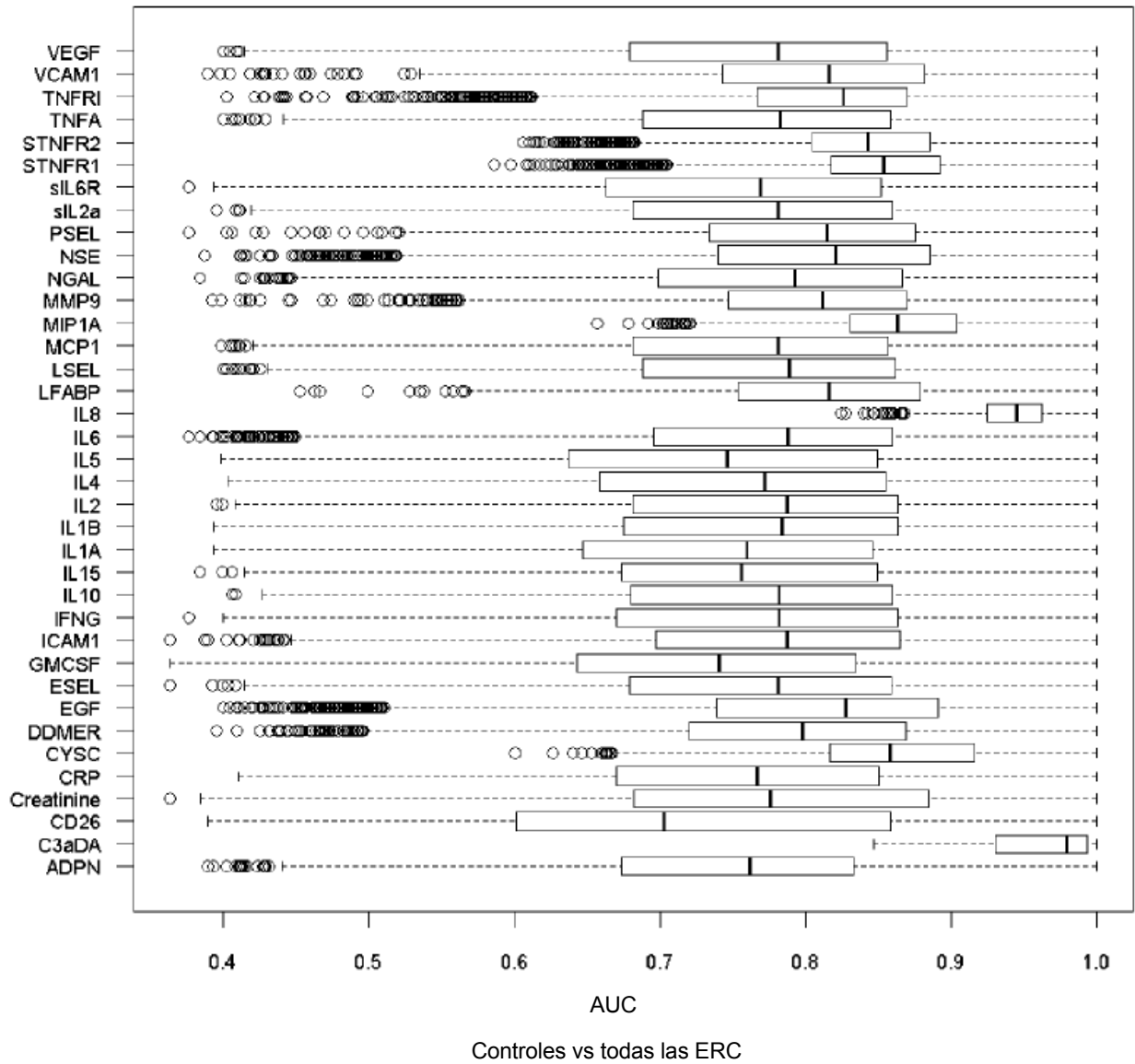


Figura 9

AUC para combinaciones que contienen cada factor

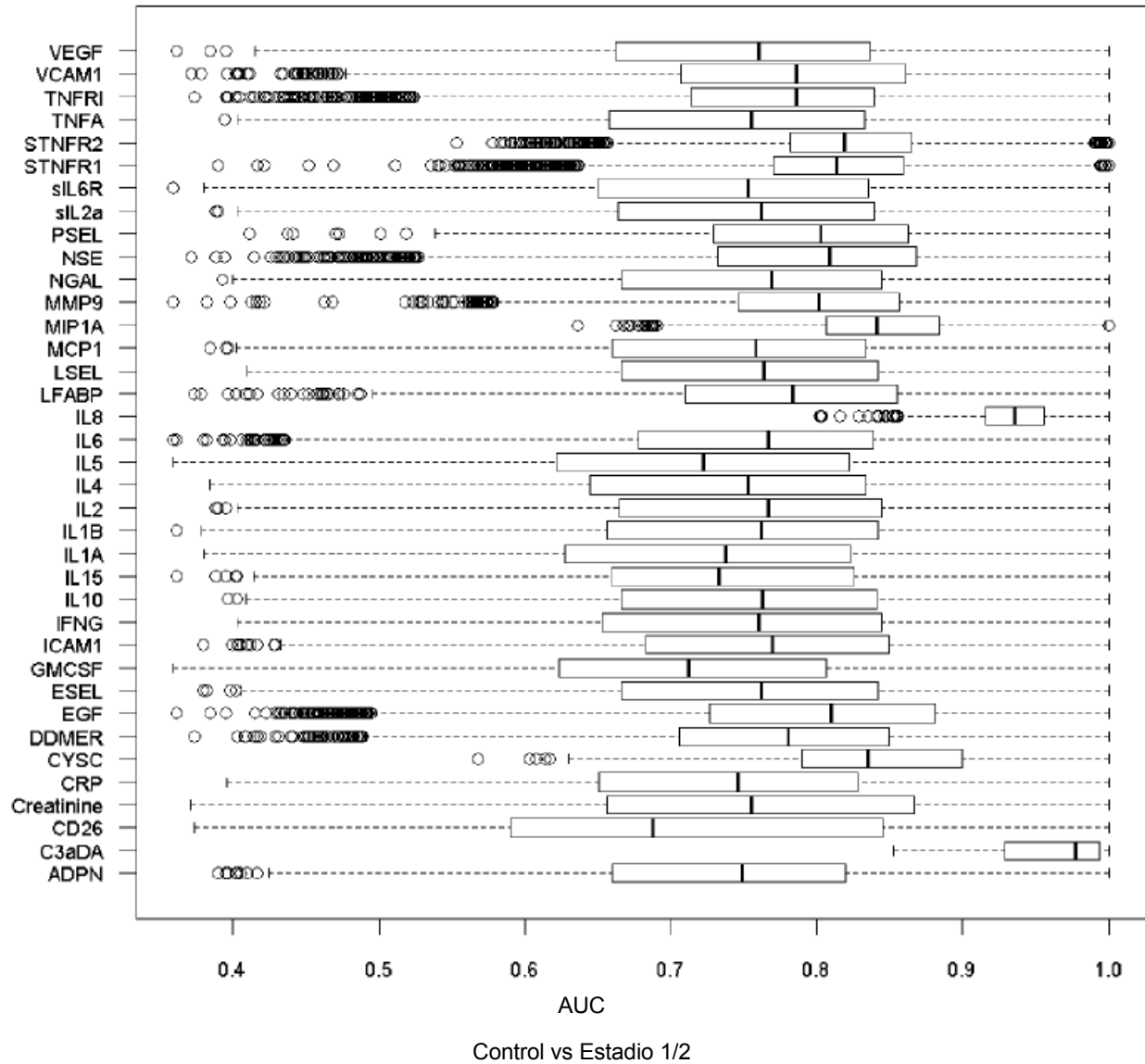


Figura 10

AUC para combinaciones que contienen cada factor

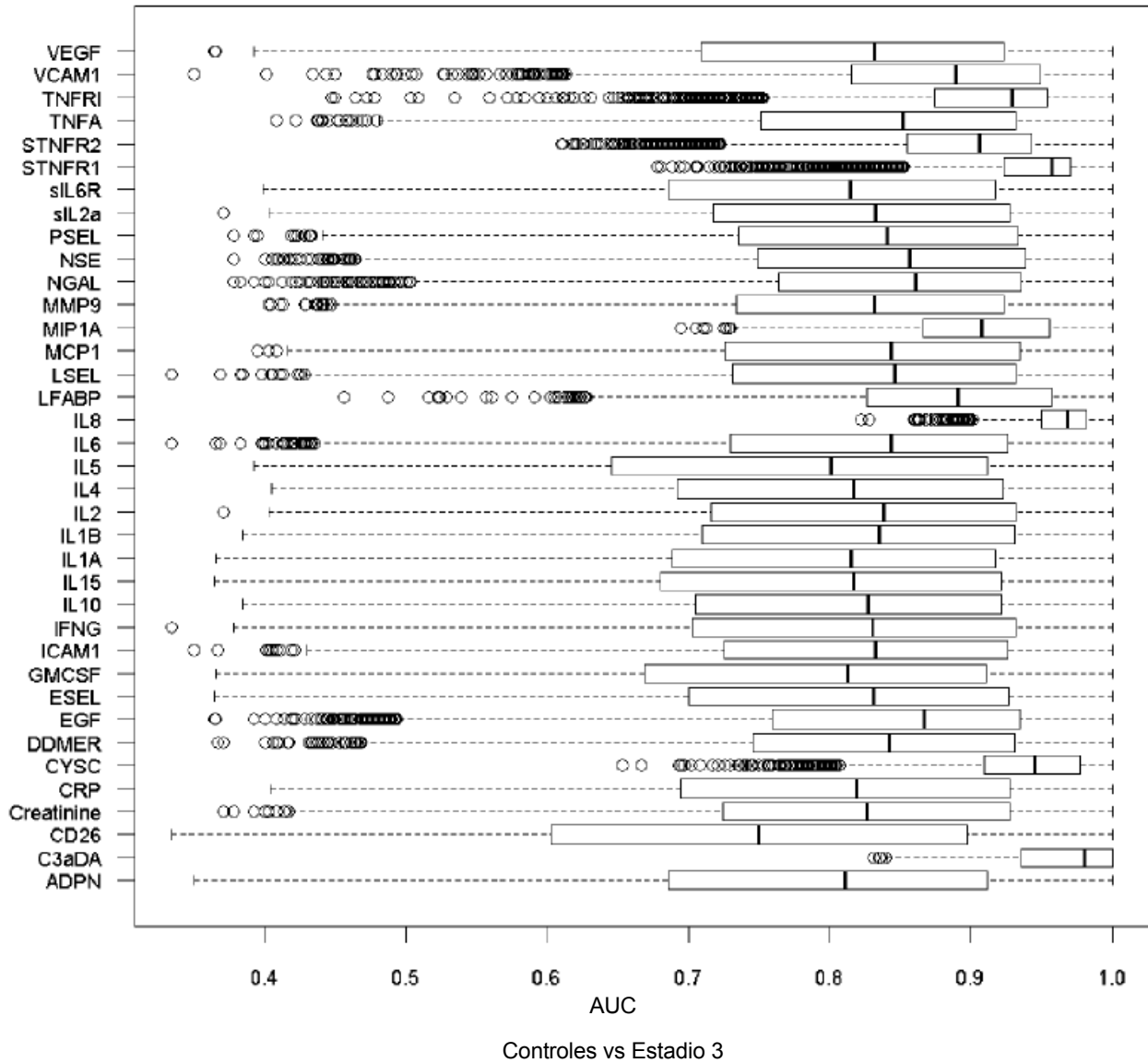


Figura 11

AUC para combinaciones que contienen cada factor

