

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 332**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2010** E 16150622 (5)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018** EP 3029156

54 Título: **Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo**

30 Prioridad:

04.09.2009 ES 200901825

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

24.04.2019

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO
RAMÓN Y CAJAL (100.0%)
Ctra. Colmenar Viejo km. 9, 100
28034 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**GARCÍA BERMEJO, MARÍA LAURA;
AGUADO FRAILE, ELIA;
LIAÑO GARCÍA, FERNANDO y
SÁENZ MORALES, DAVID**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 710 332 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

Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuadra en general dentro del campo de la biomedicina y en particular se refiere a un método para el diagnóstico y/o pronóstico del daño renal agudo.

10 **Antecedentes de la invención**

En el trasplante renal, la necrosis tubular aguda (NTA) es la causa principal del retraso en la función postrasplante del injerto. Además, la NTA contribuye a una mayor incidencia del rechazo agudo, al desarrollo de rechazo crónico y a la disminución de la supervivencia del injerto (Pannu *et al.*, 2008). El aumento en la demanda de órganos en los últimos años conlleva el uso de órganos procedentes de donantes subóptimos, incluyendo donantes en asistolia y donantes envejecidos, lo cual aumenta significativamente el porcentaje de desarrollo de NTA postrasplante, la morbilidad del injerto y el retraso en su recuperación funcional. Todo ello dispara el coste económico total de un trasplante renal para la sanidad pública. Obsérvese que las últimas estadísticas de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) indican que se realizaron en España unos 2.200 trasplantes renales/año y hay más de 4.000 pacientes aún en lista de espera (Dominguez-Gil y Pascual, 2008). Además, la NTA es la manifestación morfológica más frecuente de la insuficiencia renal aguda (IRA), incluyendo IRA de origen isquémico (Kellum *et al.*, 2008). La IRA representa uno de los problemas más graves entre las enfermedades renales en el mundo desarrollado debido a su alta mortalidad, de alrededor del 50%. Alrededor del 30% de todos los episodios de IRA se producen en pacientes ingresados en las UCI, como resultado de insuficiencia multiorgánica. En este último contexto, la mortalidad se eleva hasta el 80% (Chertow *et al.*, 2005). El desarrollo de IRA es además una de las complicaciones más habituales tras una intervención cardiaca, de las que se realizan alrededor de 30.000/año en España y más de un 1% de ellas en el presente hospital. Prácticamente todos los pacientes intervenidos desarrollan un cierto grado de IRA (Yates y Stafford-Schmit, 2006). De la gravedad de esta IRA posoperatoria depende la evolución a largo plazo de los pacientes, dando como resultado una mortalidad cercana al 60% en aquellos casos que requieran diálisis tras la intervención cardiaca (Takar *et al.*, 2005; Candela-Taha *et al.*, 2008). Tanto la cirugía cardiaca como el trasplante renal son dos situaciones “cuasi” experimentales de estudio para NTA en humanos, ya que se conoce el momento y la duración del estímulo isquémico y además pueden monitorizarse. Todas estas estadísticas de morbimortalidad no han cambiado significativamente en las últimas décadas y, hasta el momento, no existe una terapéutica eficaz para la prevención y/o reducción de NTA en todas estas situaciones. A ello ha contribuido en gran medida la falta de marcadores de daño renal que sean más precisos que la determinación de creatinina y urea en suero, que se han usado hasta ahora. Estos marcadores clásicos no reflejan directamente el daño celular ni muestran el compartimento del tejido renal (túbulo o endotelio) en el que está teniendo lugar tal daño. Son sólo parámetros indicativos de una función renal alterada como resultado del daño (Vaidya *et al.*, 2008). De hecho, es posible que pacientes con un daño renal subclínico no se identifiquen como tales porque no ha tenido lugar una alteración significativa en los niveles de creatinina y urea en suero. Así, en los últimos años, se han desarrollado numerosos estudios que han intentado identificar y validar nuevos marcadores del IRA, tales como NGAL, IL18, KIM, cistatina C, VEGF o CXCL10, que parecen funcionar como buenos marcadores en poblaciones infantiles sin patologías añadidas significativas pero no en una población adulta (Vaidya *et al.*, 2008).

La isquemia renal, la hipovolemia y los agentes tóxicos son las causas más frecuentes de desarrollo de NTA. La reducción en el flujo de sangre y como resultado la hipoxia tisular, dan como resultado daño a nivel del epitelio proximal tubular, provocan una rápida disminución de la filtración glomerular, alteran la permeabilidad vascular y desencadenan una respuesta inflamatoria que amplifica el daño tisular (Thurman *et al.*, 2007). El grado y la extensión del daño isquémico son dependientes de la gravedad y la duración de la isquemia. En isquemias subletales, se observa el desprendimiento de células epiteliales proximales, muchas de las cuales son viables, a la luz tubular. En isquemias más prolongadas, la persistente hipoxia tisular y la respuesta inflamatoria, entre otros, aumentan el daño epitelial y vascular, con muerte celular en la zona corticomédular del riñón. Además, el compartimento vascular también se daña tras la isquemia. De hecho, el daño endotelial contribuye significativamente al daño renal agudo y también al mantenimiento del mismo a lo largo del tiempo. Alteraciones tempranas en el flujo peritubular durante la isquemia y la reperfusión temprana se asocian a la pérdida de la morfología y función endoteliales contribuyendo a la pérdida de la función de barrera, la inflamación y la actividad procoagulante. A medio y largo plazo, se ha descrito pérdida de densidad microvascular, lo que favorece la progresión del daño renal crónico como resultado directo de la isquemia inicial (Basile 2007). Para resolver la NTA, se ponen en marcha mecanismos que facilitan la reparación tisular, es decir, división y diferenciación celulares a partir de las células epiteliales tubulares no dañadas. En los últimos años, varios estudios han demostrado que a la reparación del daño tubular tras la isquemia pueden contribuir no sólo las propias células epiteliales no dañadas que se desdiferencian y proliferan, sino también células pluripotentes renales e incluso células pluripotentes extrarrenales tales como las procedentes de la médula ósea (Lin 2008). Sin embargo, la contribución de células madre a la reparación del daño isquémico se cuestiona, aunque sí se acepta que a tal reparación contribuirían fundamentalmente células tubulares proximales no dañadas y la revascularización del parénquima. En este último proceso, se ha propuesto que también participarían células progenitoras endoteliales movilizadas tras la isquemia (Becherucci *et al.*, 2009).

Los miARN son ARN de pequeño tamaño (22-25 nucleótidos) codificados endógenamente capaces de reconocer ARN mensajeros y así regular negativamente la expresión de proteínas, dentro de complejos de silenciamiento inducido por ARN (RISC) por complementaridad total o parcial con su ARNm diana (Chang y Mendell, 2007). En humanos se han clonado ya más de 700 y predicciones bioinformáticas indican que todos ellos pueden controlar la expresión de más del 30% de las proteínas totales (Filipowicz *et al*, 2008). La mayoría se transcriben mediante la ARN Pol II a partir de genes individuales o a partir de transcritos policistrónicos para varios de ellos a la vez. Se generan como pre-miR más largos que se procesan en el núcleo por una ribonucleasa III (Drosha), salen al citoplasma por medio de mecanismos dependientes de exportina-5 y Ran-GTP y allí se procesan finalmente mediante otra ribonucleasa III (Dicer) a su forma madura (Rana 2007). Su función es esencial en una amplia variedad de procesos, incluyendo desarrollo embrionario, respuesta a estrés o regulación estricta de procesos fisiológicos y, por tanto, mantenimiento de la homeostasis de los organismos. Es importante destacar que el perfil de expresión de miARN es específico del tipo celular y puede cambiar dependiendo del estímulo, de manera que el contexto celular particular de un mismo miARN determinará su función en un tipo celular específico (Bartel 2009). Por este motivo, la desregulación de ciertos miARN se ha señalado entre los mecanismos responsables del desarrollo de patologías tales como cáncer (Bartels y Tsongalis, 2009), autoinmunidad (Sonkoly y Pivarcsi 2008), diabetes (Zhou *et al*, 2008) o patologías vasculares (Urbich *et al.*, 2008) y se están constituyendo como biomarcadores precisos de la evolución de muchas de ellas. Muy recientemente se ha demostrado que los miARN son además reguladores clave en la respuesta celular rápida y precisa ante cualquier tipo de estímulo, incluyendo la falta de nutrientes o la hipoxia (Ivan *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que estos miARN junto con ARNm pueden secretarse o intercambiarse por las células en forma de micropartículas (microvesículas derivadas de plaquetas; exosomas de células tumorales; ectosomas de neutrófilos (Valadi *et al.*, 2007). Así podrían detectarse en líquidos corporales tales como sangre, orina o líquido pleural. De hecho, se estima que la sangre periférica de individuos sanos puede contener una concentración de entre 5-50 mg/ml de micropartículas, que aumentaría en el caso de pacientes con diversas patologías (Hunter *et al.*, 2008). Esto permitiría hacer una monitorización muy fiable de la evolución de estas patologías utilizando muestras obtenidas mediante métodos mínimamente invasivos (extracción de sangre y recogida de orina (Gilad 2008). En orina, los miARN detectados, entre los que se incluye miR-127, han demostrado una gran estabilidad, incluso en condiciones muy agresivas (Melkonyan *et al.*, 2008). Dado que la desregulación de miARN puede provocar diversas patologías, están comenzando a considerarse como nuevas dianas de acción terapéutica. De hecho, se han desarrollado herramientas para modular su expresión: pre-miR para su sobreexpresión y antagomiR (anti-miR) para su inhibición, con resultados muy esperanzadores en diversos modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* (Krutzfeldt *et al.*, 2006; Care *et al.*, 2007; Van Rooij *et al.*, 2008), aunque está todavía por determinar su validez como estrategia terapéutica en humanos.

En cuanto al papel de los miARN en respuesta a la isquemia, se ha determinado su expresión en isquemia cerebral focal en ratas, estableciéndose asociación entre la expresión de miR-145 y el daño cerebral (Dharap *et al.*, 2009). En isquemia cardíaca en humanos, miR-100 y miR-133 parecen participar en el mecanismo de daño cardíaco (Sucharov C, *et al.*, 2008). En isquemia hepática también en humanos, se ha establecido miR-223 como mediador de daño (Yu *et al.*, 2008). Por el contrario, miR-126 y miR-210 se han descrito como promotores fundamentales de angiogénesis, neovascularización y reparación tisular en respuesta a diversos estímulos, incluyendo hipoxia (Suarez y Sessa, 2009; Fasanaro *et al.*, 2008; van Solingen *et al.*, 2008). Hasta el momento, no se han descrito en la bibliografía miARN modulados en I/R renal, pero los expertos han comenzado a especular sobre su potencial como biomarcadores en patologías renales, incluidas aquellas que implican alteraciones en la regulación de la tensión arterial (Liang M *et al*, 2009). En otro contexto, se han identificado algunos miARN relacionados con el rechazo inmunitario en trasplante renal (Sui *et al*, 2008).

Todo lo anterior justifica la necesidad de identificar y validar nuevos biomarcadores de evolución del daño renal que sean más precisos e indicativos de qué compartimento tisular está dañándose y/o recuperándose y en qué grado tiene lugar esto, cuya determinación además sea rápida, sencilla y no requiera una biopsia del paciente.

Descripción de la invención

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo que comprende analizar una muestra obtenida de un paciente para determinar el nivel de expresión de al menos miR-127, y comparar dicho nivel de expresión con un valor control, donde la alteración de dicho nivel es indicativo de daño renal.

En un aspecto más en particular de la presente invención, la muestra del paciente que va a analizarse es sangre. En otro aspecto en particular de la presente invención, la muestra es suero. En otro aspecto de la presente divulgación, la muestra es orina.

En un aspecto más particular de la presente invención, el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo se lleva a cabo determinando el nivel de expresión del miR-127 solo o en combinación con al menos un microARN seleccionado de miR-126, miR-210 y miR-101.

En un aspecto más particular de la presente invención, la disminución del nivel de expresión de miR-127 en suero

con respecto al valor control es indicativa de daño renal agudo.

En un aspecto más particular de la presente invención, el aumento del nivel de expresión de miR-127 en orina con respecto al valor control es indicativo de daño renal agudo.

5 En un aspecto más particular de la presente divulgación, el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo se lleva a cabo determinando el nivel de expresión de miR-126 solo o en combinación con al menos un microARN seleccionado de miR-127, miR-210 y miR-101.

10 En un aspecto más particular de la presente divulgación, la disminución del nivel de expresión de miR-126 en suero con respecto al valor control es indicativa de daño renal agudo.

En un aspecto más particular de la presente divulgación, el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo se lleva a cabo determinando el nivel de expresión del miR-210 solo o en combinación con al menos un microARN seleccionado de miR-127, miR-126 y miR-101.

15 En un aspecto más particular de la presente divulgación, el aumento del nivel de expresión de miR-210 en suero con respecto al valor control es indicativo de daño renal agudo.

20 En un aspecto más particular de la presente divulgación, la disminución del nivel de expresión de miR-210 en orina con respecto al valor control es indicativo de daño renal agudo.

En un aspecto más particular de la presente divulgación, el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo se lleva a cabo determinando el nivel de expresión del miR-101 solo o en combinación con al menos un microARN seleccionado de miR-127, miR-126 y miR-210.

25 En un aspecto más particular de la presente divulgación, el aumento del nivel de expresión de miR-101 en suero con respecto al valor control es indicativo de daño renal agudo.

30 En la presente invención, "daño renal agudo" se refiere al daño renal con una etiología isquémica que es o bien primaria o bien secundaria, como es el caso del daño renal debido a agentes tóxicos o medios de radiocontraste, y en cualquier caso, excluyendo daño renal crónico.

35 En un aspecto más particular de la presente invención, la expresión de microARN se determina mediante PCR. En un aspecto más particular, la expresión de microARN se determina mediante PCR cuantitativa. En un aspecto más particular, la expresión de microARN se determina mediante PCR múltiplex.

En otro aspecto más particular de la presente invención, la expresión de microARN se determina mediante micromatrices de ARN total.

40 En un segundo aspecto, la presente divulgación se refiere a un kit para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo que comprende las sondas y los cebadores necesarios para llevar a cabo el método de la presente divulgación.

45 En un aspecto particular de la presente divulgación, el kit comprende las sondas y los cebadores necesarios para determinar el nivel de expresión de al menos un microARN seleccionado de miR-127, miR-126, miR-210 y miR-101.

En otro aspecto más particular de la presente divulgación, el kit comprende una micromatriz de ARN.

50 **Descripción de las figuras**

La figura 1 muestra la expresión de miR-126 en células proximales tubulares humanas HK-2 sometidas al protocolo de hipoxia/reoxigenación: NX: células en condiciones normales en cuanto a disponibilidad de oxígeno (normoxia, 21%) y a disponibilidad de nutrientes (medio completo con FBS al 10%) CC: células control que han padecido restricción de nutrientes (están en medio sin nutrientes). Hyp: células que han padecido restricción de nutrientes y oxígeno durante 6 h (1% de oxígeno en medio sin nutrientes); R-3, R-6, R-24 h: células que tras 6 h de hipoxia vuelven a estar en condiciones normales de disponibilidad de oxígeno y nutrientes.

60 La figura 2 muestra la expresión de miR-210 en células proximales tubulares humanas HK-2 sometidas al protocolo de hipoxia/reoxigenación. NX: células en condiciones normales en cuanto a disponibilidad de oxígeno (normoxia, 21%) y a disponibilidad de nutrientes (medio completo con FBS al 10%) CC: células control que han padecido restricción de nutrientes (están en medio sin nutrientes). Hyp: células que han padecido restricción de nutrientes y oxígeno (1% de oxígeno en medio sin nutrientes); R-3, R-6, R-24 h: células que vuelven a estar en condiciones normales de disponibilidad de oxígeno y nutrientes.

65 La figura 3 muestra la expresión de miR-101 en células proximales tubulares humanas HK-2 sometidas al protocolo

5 de hipoxia/reoxigenación. NX: células en condiciones normales en cuanto a disponibilidad de oxígeno (normoxia, 21%) y a disponibilidad de nutrientes (medio completo con FBS al 10%) CC: células control que han padecido restricción de nutrientes (están en medio sin nutrientes). Hyp: células que han padecido restricción de nutrientes y oxígeno (1% de oxígeno en medio sin nutrientes); R-3, R-6, R-24 h: células que vuelven a estar en condiciones normales de disponibilidad de oxígeno y nutrientes.

10 La figura 4 muestra la expresión de miR-127 en células proximales tubulares humanas HK-2 sometidas al protocolo de hipoxia/reoxigenación. NX: células en condiciones normales en cuanto a disponibilidad de oxígeno (normoxia, 21%) y a disponibilidad de nutrientes (medio completo con FBS al 10%) CC: células control que han padecido restricción de nutrientes (están en medio sin nutrientes). Hyp: células que han padecido restricción de nutrientes y oxígeno (1% de oxígeno en medio sin nutrientes); R-3, R-6, R-24 h: células que vuelven a estar en condiciones normales de disponibilidad de oxígeno y nutrientes.

15 La figura 5 muestra la expresión de miR-101 en células proximales tubulares de rata NRK-52E sometidas al protocolo de hipoxia/reoxigenación. NX: células en condiciones normales en cuanto a disponibilidad de oxígeno (normoxia, 21%) y a disponibilidad de nutrientes (medio completo con FBS al 10%) CC: células control que han padecido restricción de nutrientes (están en medio sin nutrientes). Hyp: células que han padecido restricción de nutrientes y oxígeno (1% de oxígeno en medio sin nutrientes); R-15 min, R-30 min, R-1 h, R-3 h, R-6 h, R-24 h: células que vuelven a estar en condiciones normales de disponibilidad de oxígeno y nutrientes.

20 La figura 6 muestra la expresión de miR-127 en células proximales tubulares de rata NRK-52E sometidas al protocolo de hipoxia/reoxigenación. NX: células en condiciones normales en cuanto a disponibilidad de oxígeno (normoxia, 21%) y a disponibilidad de nutrientes (medio completo con FBS al 10%) CC: células control que han padecido restricción de nutrientes (están en medio sin nutrientes). Hyp: células que han padecido restricción de nutrientes y oxígeno (1% de oxígeno en medio sin nutrientes); R-15 min, R-30 min, R-1 h, R-3 h, R-6 h, R-24 h: células que vuelven a estar en condiciones normales de disponibilidad de oxígeno y nutrientes.

25 La figura 7 muestra la expresión de miR-101 en células endoteliales humanas HMEC sometidas al protocolo de hipoxia/reoxigenación. NX: células en condiciones normales en cuanto a disponibilidad de oxígeno (normoxia, 21%) y a disponibilidad de nutrientes (medio completo con FBS al 10%) CC: células control que han padecido restricción de nutrientes (están en medio sin nutrientes). Hyp: células que han padecido restricción de nutrientes y oxígeno (1% de oxígeno en medio sin nutrientes); R-15 min, R-30 min, R-1 h, R-3 h, R-24 h: células que vuelven a estar en condiciones normales de disponibilidad de oxígeno y nutrientes.

30 La figura 8 muestra la expresión de miR-127 en células endoteliales humanas HMEC sometidas al protocolo de hipoxia/reoxigenación. NX: células en condiciones normales en cuanto a disponibilidad de oxígeno (normoxia, 21%) y a disponibilidad de nutrientes (medio completo con FBS al 10%) CC: células control que han padecido restricción de nutrientes (están en medio sin nutrientes). Hyp: células que han padecido restricción de nutrientes y oxígeno (1% de oxígeno en medio sin nutrientes); R-15 min, R-30 min, R-1 h, R-3 h, R-24 h: células que vuelven a estar en condiciones normales de disponibilidad de oxígeno y nutrientes.

35 La figura 9 muestra la expresión de miR-210 en células endoteliales humanas HMEC sometidas al protocolo de hipoxia/reoxigenación. NX: células en condiciones normales en cuanto a disponibilidad de oxígeno (normoxia, 21%) y a disponibilidad de nutrientes (medio completo con FBS al 10%) CC: células control que han padecido restricción de nutrientes (están en medio sin nutrientes). Hyp: células que han padecido restricción de nutrientes y oxígeno (1% de oxígeno en medio sin nutrientes); R-15 min, R-30 min, R-1 h, R-3 h, R-24 h: células que vuelven a estar en condiciones normales de disponibilidad de oxígeno y nutrientes.

40 La figura 10 muestra la expresión de miR-126 en células endoteliales humanas HMEC sometidas al protocolo de hipoxia/reoxigenación. NX: células en condiciones normales en cuanto a disponibilidad de oxígeno (normoxia, 21%) y a disponibilidad de nutrientes (medio completo con FBS al 10%) CC: células control que han padecido restricción de nutrientes (están en medio sin nutrientes). Hyp: células que han padecido restricción de nutrientes y oxígeno (1% de oxígeno en medio sin nutrientes); R-15 min, R-30 min, R-1 h, R-3 h, R-24 h: células que vuelven a estar en condiciones normales de disponibilidad de oxígeno y nutrientes.

45 La figura 11 muestra la expresión de miR-127 en suero de pacientes diagnosticados de insuficiencia renal aguda (IRA) de etiología isquémica. Control: expresión de miARN en control sano igualado a 1. Los datos de expresión en el paciente están relativizados a estos datos. 0 h y 3 días: tiempos en los que se ha tomado una muestra del paciente, al ingresar por IRA (0 h) y más tarde durante su evolución (3 días).

50 La figura 12 muestra la expresión de miR-127 en orina de pacientes diagnosticados de insuficiencia renal aguda (IRA) de etiología isquémica. Control: expresión de miARN en control sano igualado a 1. Los datos de expresión en el paciente están relativizados a estos datos. 0 h y 3 días: tiempos en los que se ha tomado una muestra del paciente, al ingresar por IRA (0 h) y más tarde durante su evolución (3 días).

55 La figura 13 muestra la expresión de miR-126 en suero de pacientes diagnosticados de insuficiencia renal aguda

(IRA) de etiología isquémica. Control: expresión de miARN en control sano igualado a 1. Los datos de expresión en el paciente están relativizados a estos datos. 0 h y 3 días: tiempos en los que se ha tomado una muestra del paciente, al ingresar por IRA (0 h) y más tarde durante su evolución (3 días).

- 5 La figura 14 muestra la expresión de miR-210 en suero de pacientes diagnosticados de insuficiencia renal aguda (IRA) de etiología isquémica. Control: expresión de miARN en control sano igualado a 1. Los datos de expresión en el paciente están relativizados a estos datos. Día 0, día 1, día 2, día 3, día 7: tiempos en los que se ha tomado una muestra del paciente, al ingresar por IRA (día 0) y más tarde durante su evolución.
- 10 La figura 15 muestra la expresión de miR-210 en orina de pacientes diagnosticados de insuficiencia renal aguda (IRA) de etiología isquémica. Control: expresión de miARN en control sano igualado a 1. Los datos de expresión en el paciente están relativizados a estos datos. Día 0, día 1, día 2, día 3, día 7: tiempos en los que se ha tomado una muestra del paciente, al ingresar por IRA (día 0) y más tarde durante su evolución.
- 15 La figura 16 muestra la expresión de miR-101 en suero de pacientes diagnosticados de insuficiencia renal aguda (IRA) de etiología isquémica. Control: expresión de miARN en control sano igualado a 1. Los datos de expresión en el paciente están relativizados a estos datos. 0 días, 1 día, 2 días, 3 días, 7 días: tiempos en los que se ha tomado una muestra del paciente, al ingresar por IRA (0 d) y más tarde durante su evolución.
- 20 La figura 17 muestra la expresión de miR-101 en muestras de suero a: en pacientes pertenecientes al grupo IA, b: en pacientes pertenecientes al grupo IB y c: en pacientes pertenecientes al grupo II.
- La figura 18 muestra la expresión de mi R-127 en muestras de suero a: en pacientes pertenecientes al grupo IA, b: en pacientes pertenecientes al grupo IB y c: en pacientes pertenecientes al grupo II.
- 25 La figura 19 muestra la expresión de miR-126 en muestras de suero a: en pacientes pertenecientes al grupo IA, b: en pacientes pertenecientes al grupo IB y c: en pacientes pertenecientes al grupo II.
- La figura 20 muestra la expresión de miR-210 en muestras de suero a: en pacientes pertenecientes al grupo IA, b: en pacientes pertenecientes al grupo IB y c: en pacientes pertenecientes al grupo II.
- 30

Descripción detallada de la invención

- 35 Se identificó mediante el uso de matrices que los microARN: miR-127, miR-126, miR-210 y miR-101 en un modelo de H/R que imita I/R se expresaban de forma diferencial de manera que cada uno de estos microARN, solos o en combinación, sirven como biomarcadores del daño renal.

EJEMPLO 1: Expresión de miARN en líneas celulares sometidas a hipoxia/reoxigenación.

- 40 Se procedió al cultivo de las siguientes células (HK2: células proximales tubulares humanas, NRK-52E: células proximales tubulares de rata y HMEC: células endoteliales microvasculares humanas) en medios apropiados que contenían suero, antibióticos y factores de crecimiento específicos. Se mantuvieron a 37°C, bajo una atmósfera húmeda y con un 5% de CO₂.
- 45 Las líneas celulares descritas anteriormente se sometieron a un protocolo de hipoxia/reoxigenación. Es decir, las líneas celulares se someten a cambios en las tensiones de oxígeno y en la disponibilidad de nutrientes. Para ello, se utilizaron dos incubadores diferentes: hipoxia en un incubador sellado a 37°C, perfundido con una mezcla del 5% de CO₂, el 1% de O₂, el 94% de N₂; reoxigenación, en un incubador convencional a 37°C, con el 5% de CO₂. Las células se hicieron crecer hasta la confluencia y se privaron de suero 24 horas antes de la hipoxia. Durante la hipoxia, se mantuvieron en medio mínimo (HBSS) sin suero, con una baja concentración de glucosa o derivados.
- 50 Durante la reoxigenación, se utilizó un medio completo (Sáenz-Morales *et al.*, 2006). El tiempo de hipoxia para todas las muestras fue de 6 h, y los tiempos de reoxigenación fueron variables (15 min-72 h). Todos los experimentos *in vitro* se repitieron al menos 3 veces.
- 55 Luego se determinó la expresión de diferentes microARN en las líneas celulares mediante PCR, para ello y tras la extracción del ARN total de las muestras de fluidos (suero u orina) y para la titulación, se utilizaron 50 nanogramos de cada una de ellos para la reacción de transcripción inversa (RT) en 15 microlitros. Para esta etapa se utilizaron cebadores comerciales especiales (cebadores de tallo-bucle). Estos cebadores eran específicos para cada miARN. Tras la RT, se procedió a la reacción de amplificación cuantitativa (qPCR). En esta reacción, llevada a cabo en un volumen total de 10 microlitros, se utilizó 1 microlitro de la reacción de RT total y cebadores específicos para cada miARN, así como una sonda Taqman con agentes que atrapan la fluorescencia. Todos los reactivos, tanto cebadores como mezclas de reacción con enzimas y nucleótidos para RT y PCR que se utilizaron eran de Applied Biosystems. Los resultados fueron los siguientes:
- 60
- 65 Tal como se muestra en la figura 1 los niveles de expresión de miR-126 fueron muy dependientes de la disponibilidad de nutrientes y oxígeno, ya que la restricción de ambos disminuyó muy significativamente su

5 expresión con respecto a la condición de normalidad. La expresión de miARN se recuperó en el tiempo de reoxigenación, en el que las células volvieron a disponer de oxígeno y nutrientes. Por tanto, la disminución en la expresión de miR-126 indicó falta de nutrientes y oxígeno en células proximales tubulares, lo que es indicativo de isquemia renal. Además, y dado que a las 3 h de la reoxigenación se registró un daño significativo del epitelio *in vitro*, la baja expresión de este miARN indicó daño del epitelio proximal tubular tras la isquemia.

10 Tal como se muestra en la figura 2, los niveles de expresión de miR-210, como miR-126, fueron muy dependientes de la disponibilidad de nutrientes y oxígeno, ya que la restricción de ambos disminuyó muy significativamente su expresión con respecto a la condición de normalidad. La expresión de miARN se recuperó en el tiempo de reoxigenación, en el que las células volvieron a disponer de oxígeno y nutrientes. La disminución de miR-210 indicó falta de nutrientes y oxígeno en células proximales tubulares, lo que es indicativo, como en el caso de miR-126, de isquemia renal. Además, y dado que a las 3 h de reoxigenación se registró daño del epitelio *in vitro*, la baja expresión del miR-210 indicó daño del epitelio proximal tubular tras la isquemia.

15 Tal como muestra en la figura 3, la expresión de miR-101 aumentó en la condición de hipoxia en comparación con la condición de normoxia. La expresión de este miARN se normalizó gradualmente de nuevo en reoxigenación, en la que volvió a normalizarse la disponibilidad de oxígeno y nutrientes. El aumento de expresión de este miARN en células proximales durante la condición de hipoxia fue indicativo de isquemia renal.

20 Tal como muestra en la figura 4, la expresión de miR-127 aumentó en la condición de hipoxia en comparación con la condición de normoxia. La expresión de este miARN disminuyó significativamente en reoxigenación, aumentando de nuevo a las 24 h de reoxigenación cuando la monocapa epitelial está recuperándose. Por tanto, el aumento de expresión de miR-127 en células proximales durante la condición de hipoxia fue indicativo de isquemia renal. La disminución de su expresión tempranamente en reoxigenación indicó daño isquémico y su aumento posterior indicó recuperación endotelial.

25 Tal como muestra en la figura 5, la expresión de miR-101 se normalizó rápidamente en reoxigenación, en la que volvió a normalizarse la disponibilidad de oxígeno y nutrientes, si bien permaneció con niveles de expresión más elevados que en la condición de normoxia en estas células de rata. El aumento de expresión de este miARN en células proximales durante la condición de hipoxia fue indicativo de isquemia renal. Su nuevo aumento a las 24 h de reoxigenación indicó recuperación de la monocapa epitelial.

30 Tal como se muestra en la figura 6 y tal como se produjo en células Hk-2 (tubulares humanas), la expresión de miR-127 aumentó en la condición de hipoxia, en la que está restringida la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno, en comparación con la condición de normoxia. La expresión de este miARN se normalizó rápidamente en reoxigenación, en la que volvieron a estar disponibles el oxígeno y los nutrientes. El aumento de expresión de este miARN en células proximales durante la condición de hipoxia fue indicativo de isquemia renal.

35 Tal como se muestra en la figura 7 y tal como se produjo en células proximales tubulares, la expresión de miR-101 aumentó en la condición de hipoxia en comparación con la condición de normoxia. La expresión de este miARN permaneció elevada en reoxigenación, en la que volvieron a normalizarse la disponibilidad de oxígeno y nutrientes, y comenzó a normalizarse a las 24 h de reoxigenación. El aumento de expresión de este miARN en células endoteliales durante la condición de hipoxia fue indicativo de isquemia renal. Su elevada expresión en reoxigenación se asoció a un estado de activación endotelial (proinflamatorio), que comenzó a normalizarse a las 24 h.

40 Tal como se muestra en la figura 8 y tal como se produjo en células proximales tubulares, la expresión de miR-127 aumentó en la condición de hipoxia, en la que estaba restringida la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno, en comparación con la condición de normoxia. La expresión de este miARN permaneció elevada en reoxigenación, en la que se dispuso de oxígeno y nutrientes, y comenzó a normalizarse a las 24 h de reoxigenación. El aumento de expresión de este miARN en células endoteliales durante la condición de hipoxia fue indicativo de isquemia renal. Su elevada expresión en reoxigenación se asoció a un estado de activación endotelial (proinflamatorio), que comenzó a normalizarse a las 24 h.

45 Tal como se muestra en la figura 9 y a diferencia de lo que se produjo con este miARN en células proximales tubulares, la expresión de miR-210 aumentó discretamente en la condición de hipoxia en comparación con la condición de normoxia. La expresión de este miARN permaneció elevada en reoxigenación y la expresión disminuyó bruscamente a las 24 h de reoxigenación. El aumento de expresión de este miARN en células endoteliales durante la condición de hipoxia fue indicativo de isquemia renal. Como miR-127 y miR-101, su expresión en reoxigenación se asoció a un estado de activación endotelial (proinflamatorio), que comenzó a normalizarse a las 24 h.

50 Tal como se muestra en la figura 10, la expresión de miR-126 aumentó discretamente en la condición de hipoxia, en la que está restringida la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno, en comparación con la condición de normoxia. Aumentó muy significativamente a 1 h de reoxigenación, en la que se dispuso de oxígeno y nutrientes. Tras ello, la expresión de este miARN se normalizó. El aumento de expresión de este miARN en células endoteliales durante la condición de hipoxia fue indicativo de isquemia renal. Un aumento significativo de este tipo a 1 h de reoxigenación se asoció de manera inequívoca a un estado máximo de activación endotelial (proinflamatorio).

EJEMPLO 2: Expresión de miARN en pacientes a los que se les ha diagnosticado insuficiencia renal aguda.

5 El estudio con muestras de pacientes se llevó a cabo de manera prospectiva. Tras la autorización por parte de los pacientes o sus representantes legales mediante el pertinente consentimiento informado y previa aprobación del estudio por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital, se extrajeron muestras de sangre y orina y biopsias renales en caso de trasplante de los grupos de pacientes descritos a continuación.

10 Muestras de pacientes de trasplante renal

Se analizaron muestras procedentes de 50 pacientes de trasplante (pacientes con trasplante renal *de novo* y con diferentes regímenes de inmunosupresión), estando dichos pacientes organizados en dos grupos:

15 I. 25 pacientes con función inmediata del injerto

II. 25 pacientes con función retrasada del injerto

20 Se tomaron muestras de sangre y orina los días 1, 7, 15, 30 tras el trasplante renal, y se determinó en las mismas la expresión de los miARN que iban a estudiarse mediante qRT-PCR.

En caso de no función del injerto, se realizó una biopsia el séptimo día, que se repitió cada 7-10 días hasta que se resolvió la fase de NTA. En caso de sospecha de rechazo y tras su confirmación por biopsia, estos pacientes se excluyeron.

25 En el caso de pacientes trasplantados, se recogió la siguiente información y se puso a disposición:

- Características del receptor: edad, sexo y tiempo en diálisis.

30 - Características del donante: tipo de donante (muerte encefálica, asistolia), edad, sexo, necesidad de fármacos vasoactivos y última creatinina.

- Características del injerto: tiempos de isquemia caliente, fría y de anastomosis. Compatibilidad de HLA e inmunosupresión.

35 - Función del injerto a las 2, 4 y 12 semanas.

Se recogieron muestras de sangre en tubos VACUETTE (z serum sep clot activator) de 8 ml, que se centrifugaron a 2.500 rpm 10 minutos.

40 Se recogió el suero separado por centrifugación y se alícuotó y almacenó conforme a los criterios del Biobanco del Hospital Ramón y Cajal (en tubos anónimos, con un único código y a -80°C).

45 Se recogieron muestras de orina en viales de orina convencionales o extrajeron de la bolsa del catéter, se centrifugaron a 2.800 rpm durante 10 min para eliminar sedimentos y otros restos, y se alícuotaron y almacenaron conforme a los criterios del Biobanco del Hospital Ramón y Cajal (en tubos anónimos, con un único código y a -80°C).

50 De todas ellas se solicitó su cesión por parte del Biobanco mediante acuerdos de cesión. Se solicitaron un máximo de 500 microlitros, ya que la técnica se optimizó para amplificar miARN en muestras de 100-200 microlitros de ambos fluidos, mediante PCR cuantitativa, para cuyo fin y tras la extracción del ARN total de las muestras de fluidos (suero u orina) y para la titulación, se utilizaron 50 nanogramos de cada una de ellas para la reacción de transcripción inversa (RT) en 15 microlitros. Para esta etapa se utilizaron cebadores comerciales especiales (cebadores de tallo-bucle). Estos cebadores eran específicos para cada miARN. Tras la RT, se procedió a la reacción de amplificación cuantitativa (qPCR). En esta reacción que se llevó a cabo en un volumen total de 10 microlitros, se utilizó 1 microlitro de la reacción de RT total y cebadores específicos para cada miARN, así como una sonda Taqman con agentes que atrapan de fluorescencia. Todos los reactivos, tanto cebadores como mezclas de reacción con enzimas y nucleótidos para RT y PCR que se utilizaron eran de Applied Biosystems.

60 El procesamiento de las muestras de suero y orina de los pacientes anterior a la extracción de ARN total fue el siguiente: se digirió una alícuota de 100-200 microlitros de suero u orina con Proteinasa K (0,65 miligramos/mililitro) incubando a 56°C, 1 h. Tras ello se realizó una primera extracción con fenol/cloroformo (5:1) y la fase acuosa se procesó utilizando el kit de aislamiento de miARN High Pure (Roche), siguiendo las indicaciones del fabricante.

65 Muestras de pacientes tras cirugía cardíaca:

Se analizaron muestras procedentes de 50 pacientes, estando organizados dichos en los siguientes grupos:

- IA: 10 pacientes adultos operados tal como se programó con circulación extracorpórea (CEC) y con bajo riesgo para el desarrollo de IRA, es decir, pacientes con una puntuación de 0 a 2 en el sistema de Thakar5 o de 0 a 1 en el SRI6 simplificado.

5 - IB: 10 pacientes pediátricos con cardiopatías congénitas operados por primera vez con CEC.

-II: 15 pacientes adultos operados tal como se programó con CEC, con función renal basal alterada y puntuaciones > 5 en el sistema de Thakar5 o > 3 en el SRI6.

10 -III: 15 pacientes adultos operados tal como se programó con CEC, con función renal basal normal y con las mismas puntuaciones que en el apartado anterior.

15 Para cada paciente, se determinaron los miARN mencionados en los siguientes momentos:

- Basal preoperatorio

- A las 2 h del ingreso en la UCI

20 - A las 24 h, 48 h y 72 h de la cirugía

- El día +7 (opcional para los grupos IA y IB)

25 Tal como se muestra en la figura 11, la expresión de miR-127 disminuyó significativamente con respecto al control sano. La disminución en la expresión de este miARN en el suero de pacientes era un indicador de daño renal isquémico o IRA. Estos datos se correlacionan con los datos mostrados en la figura 18.

30 Tal como se muestra en la figura 12, y en correlación con la disminución en suero, la expresión de miR-127 aumentó significativamente con respecto al control sano. La disminución en la expresión de este miARN en el suero de pacientes y su correspondiente aumento en orina era un indicador de diagnóstico temprano de daño renal isquémico o IRA.

35 Tal como se muestra en la figura 13, los niveles de expresión de miR-126 en suero disminuyeron significativamente en el momento del inicio del daño renal isquémico y la expresión del mismo aumentó enormemente a las 24 h, para normalizarse posteriormente. Esto indicó que la disminución en la expresión de este miARN en el suero de pacientes era un indicador de diagnóstico muy temprano de daño renal isquémico o IRA. Su aumento a las 24 h indicó una activación endotelial tras la isquemia asociada a una reacción inflamatoria posterior, tal como se comentó en el modelo *in vitro*. Estos datos se correlacionan con los datos mostrados en la figura 19.

40 Tal como se muestra en la figura 14, la expresión de miR-210 en suero aumentó significativamente en el momento del inicio del daño renal isquémico, se mantuvo en las primeras 24 h, para normalizarse posteriormente. Estos datos indicaron que el aumento en la expresión de este miARN en el suero de pacientes era un marcador diagnóstico muy temprano de daño renal isquémico o IRA.

45 Tal como se observa en la figura 15, la expresión de miR-210 en orina aumentó significativamente a las 48 h, para normalizarse posteriormente. Teniendo en cuenta que la expresión de este miARN aumentó en células HK-2 a tiempos en los que empezó a observarse recuperación epitelial en el modelo experimental, esto indicó que el aumento en la expresión de este miARN a las 48 h en orina de pacientes era indicativo del inicio de la recuperación tras el daño renal isquémico. Estos datos se correlacionan con los datos mostrados en la figura 20.

50 Tal como se muestra en la figura 16, la expresión de miR-101 aumentó muy significativamente y muy tempranamente con respecto al control sano, en el momento del ingreso, y no se detectó expresión significativa con respecto al sujeto sano en el momento de la evolución. Esto indicó que un aumento en la expresión de este miARN en el suero de pacientes era un marcador de diagnóstico muy temprano de daño renal isquémico. Estos datos se correlacionan con los datos mostrados en la figura 17.

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo que comprende analizar una muestra obtenida de un paciente seleccionada de sangre o suero, para determinar el nivel de expresión de al menos miR-127, y comparar dicho nivel de expresión con un valor control, en el que la disminución en el nivel de expresión de miR-127 en suero con respecto al valor control es indicativo de daño renal agudo.
- 10 2. Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo según la reivindicación 1, en el que comprende además determinar el nivel de expresión de miR-126, en el que la disminución en el nivel de expresión de miR-126 con respecto al valor control es indicativo de daño renal agudo.
- 15 3. Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo según la reivindicación 1 ó 2, en el que comprende además determinar el nivel de expresión de al menos un microARN seleccionado de miR-210 y miR-101, en el que el aumento en el nivel de expresión de miR-210 y/o miR-101 con respecto al valor control es indicativo de daño renal agudo.
- 20 4. Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo según la reivindicación 1, en el que comprende además determinar el nivel de expresión de miR-126, miR-210 y miR-101, en el que el aumento en el nivel de expresión de miR-210 y miR-101 con respecto al valor control y la disminución en el nivel de expresión de miR-126 con respecto al valor control es indicativo de daño renal agudo.
- 25 5. Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la expresión de microARN se determina mediante PCR.
- 30 6. Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la expresión de microARN se determina mediante PCR cuantitativa.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el nivel de expresión de microARN se determina mediante micromatrices de ARN.

FIG. 1

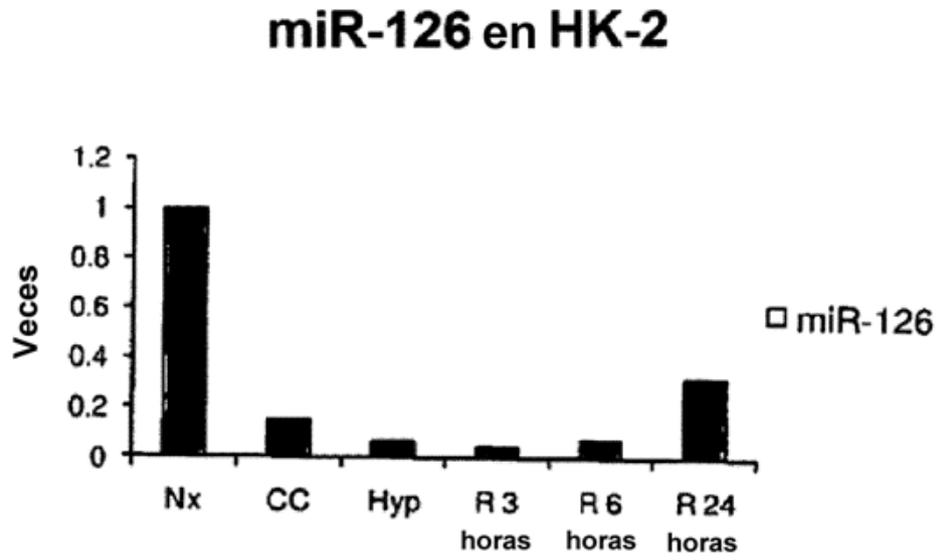


FIG. 2

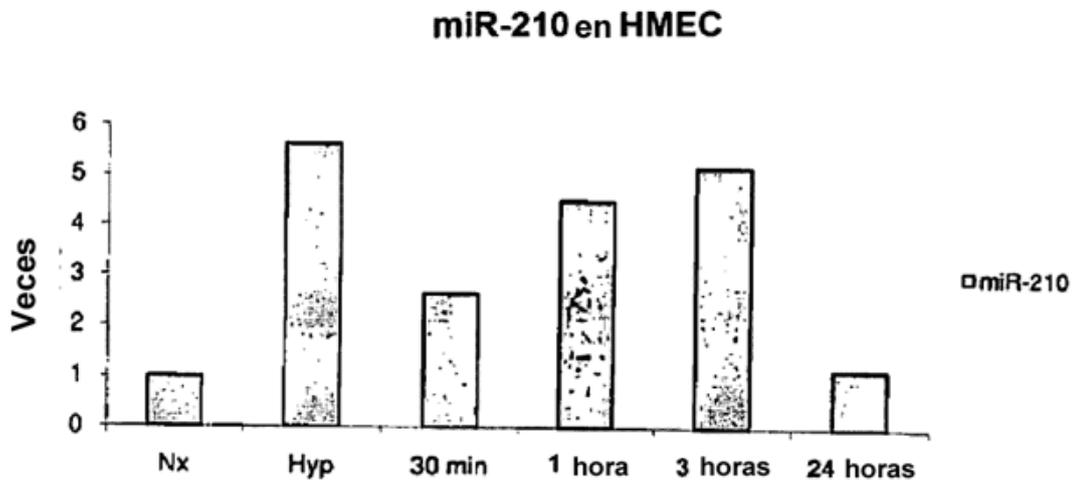


FIG. 3

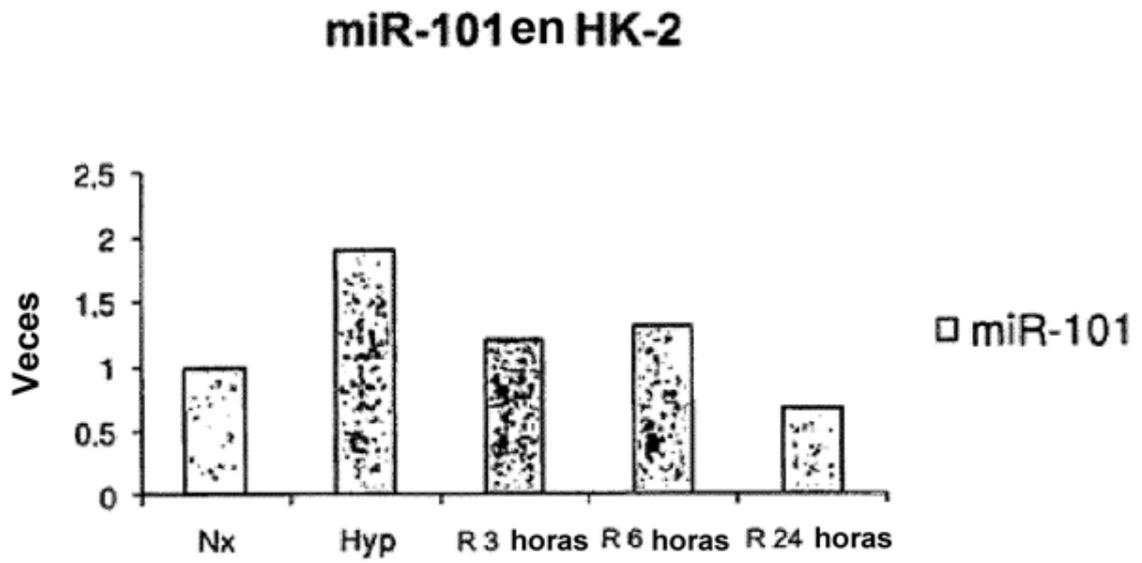


FIG. 4

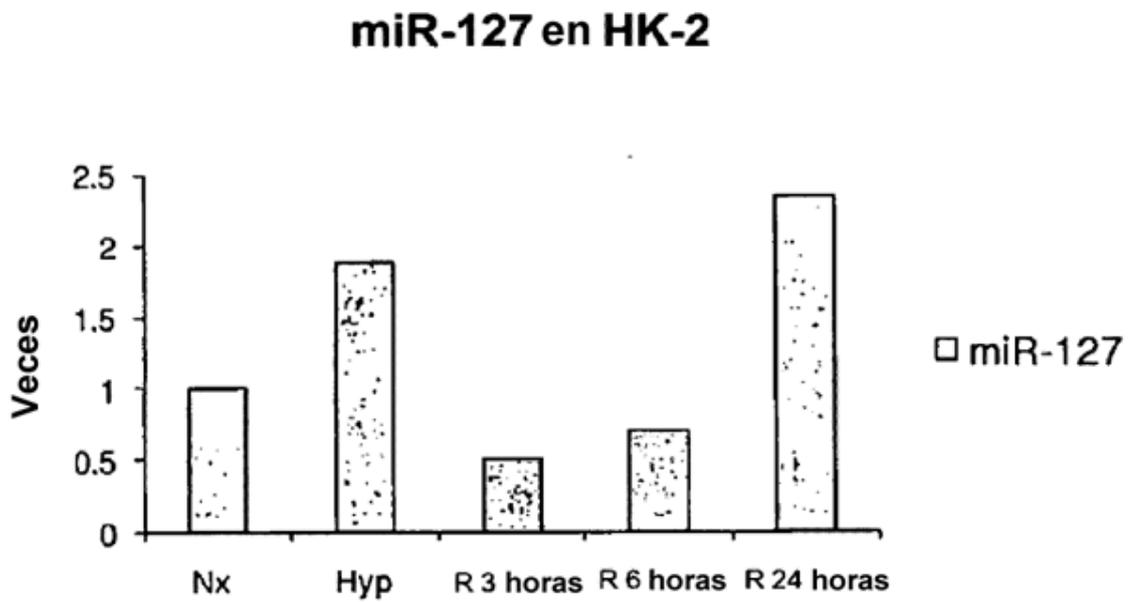


FIG. 5

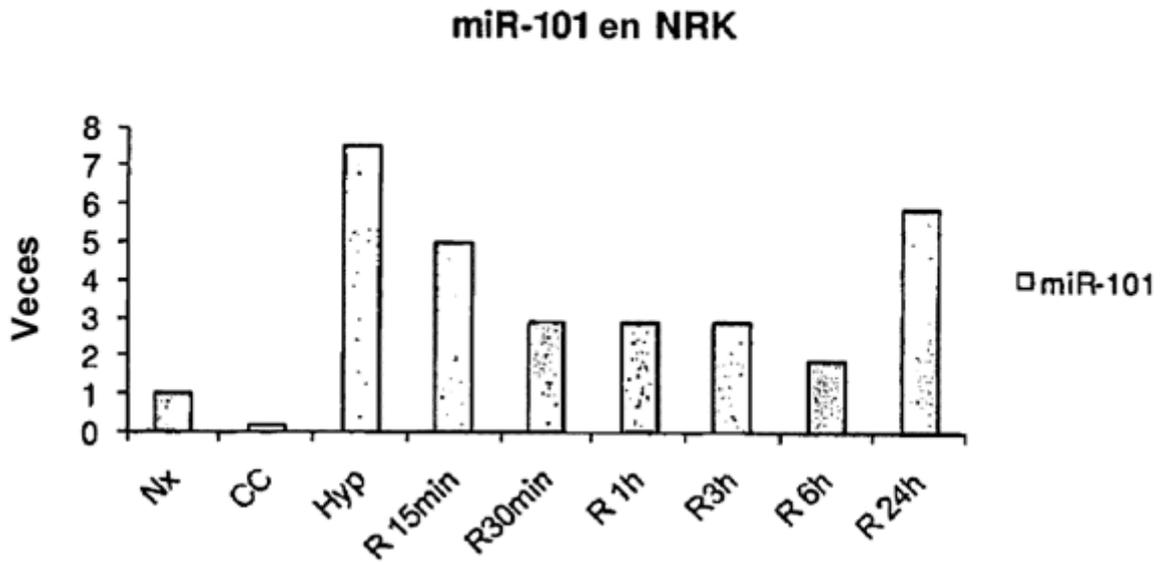


FIG. 6

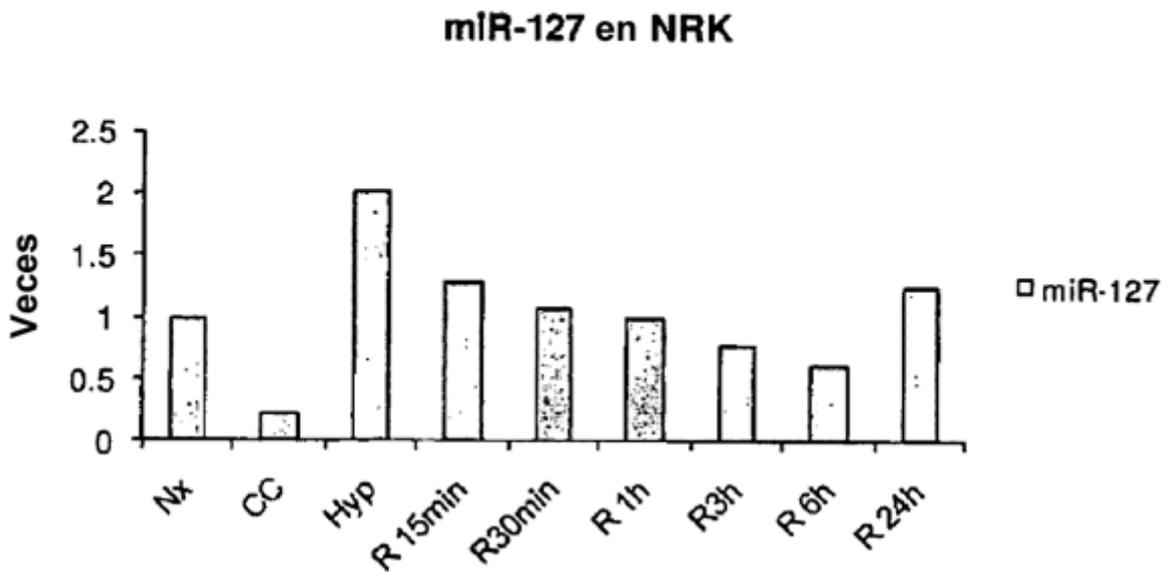


FIG. 7

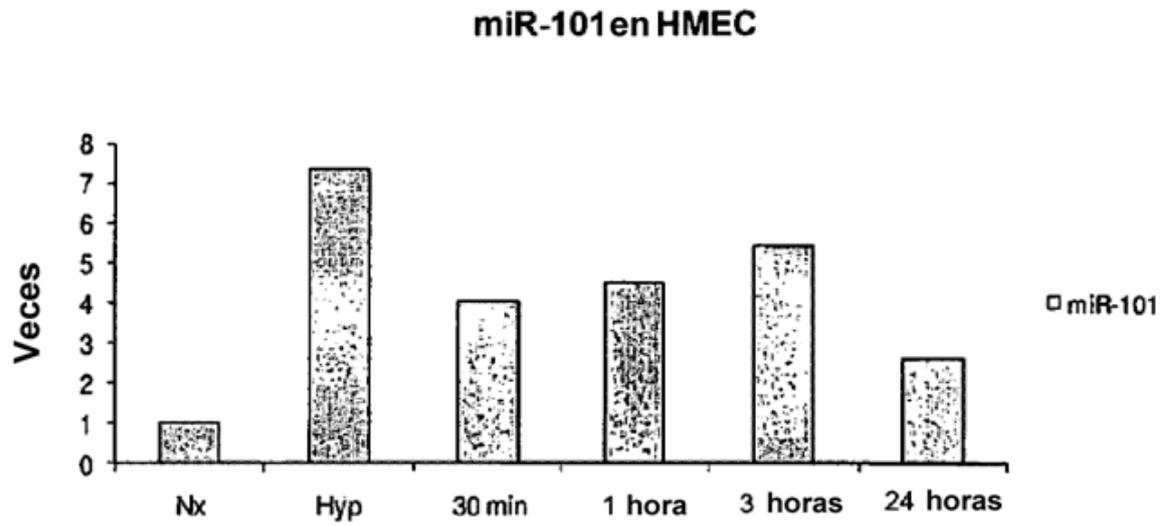


FIG. 8

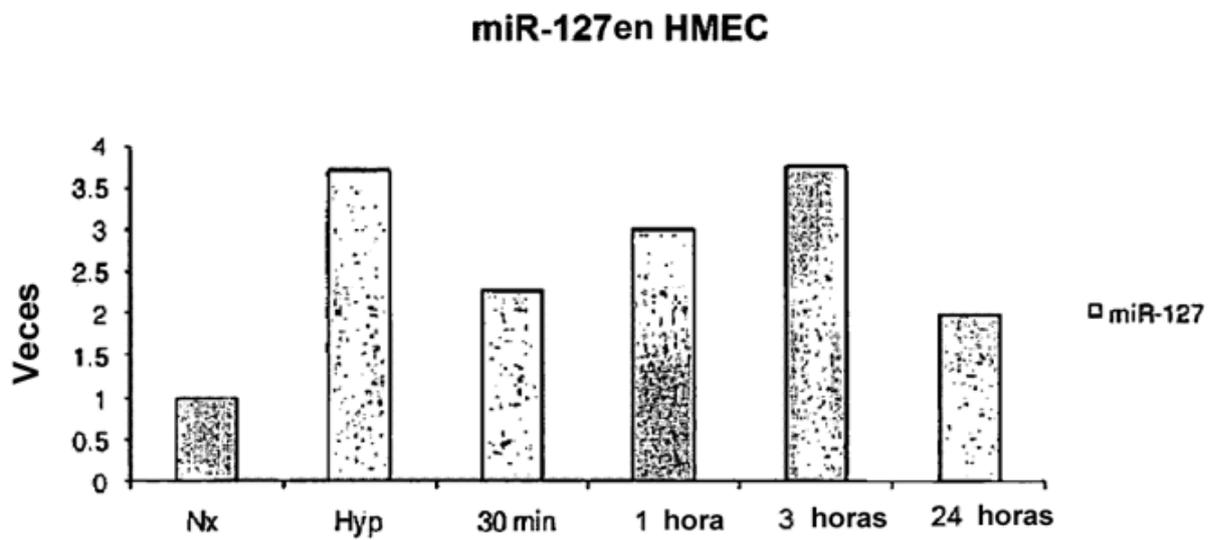


FIG. 9

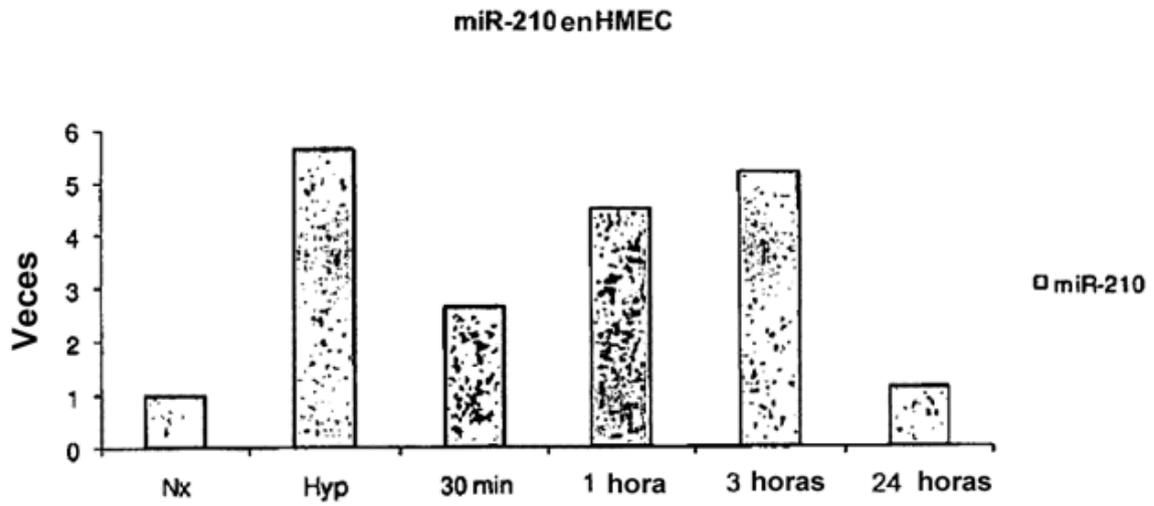


FIG. 10

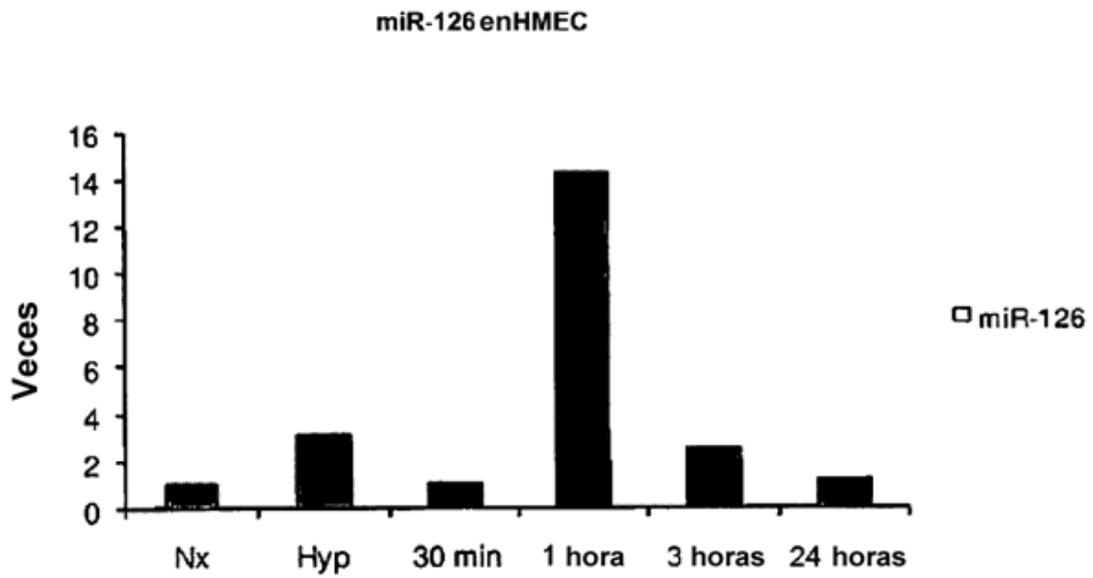


FIG. 11

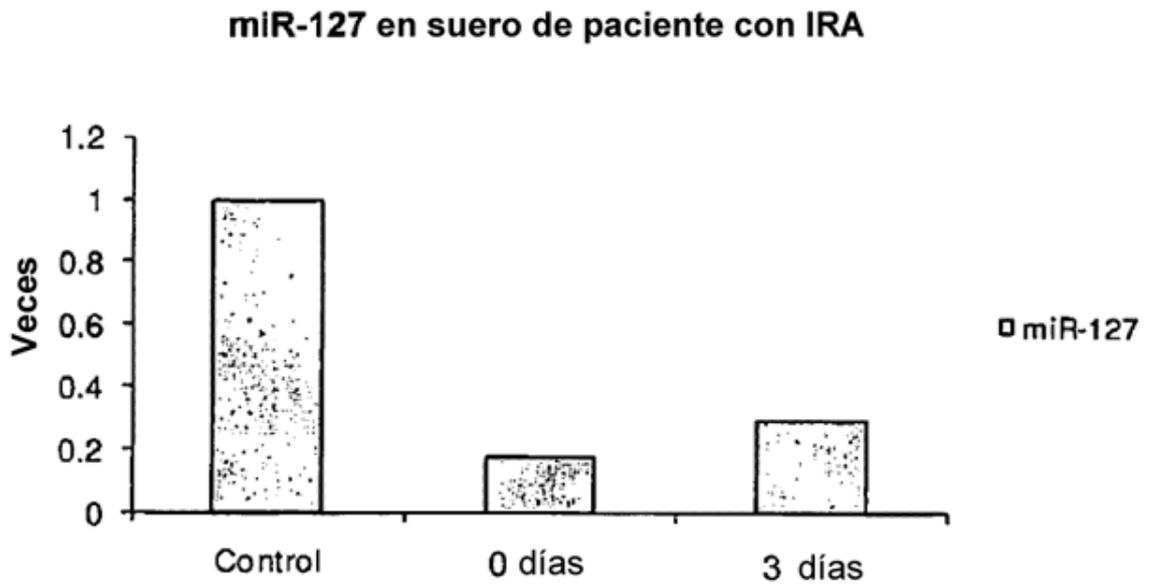


FIG. 12

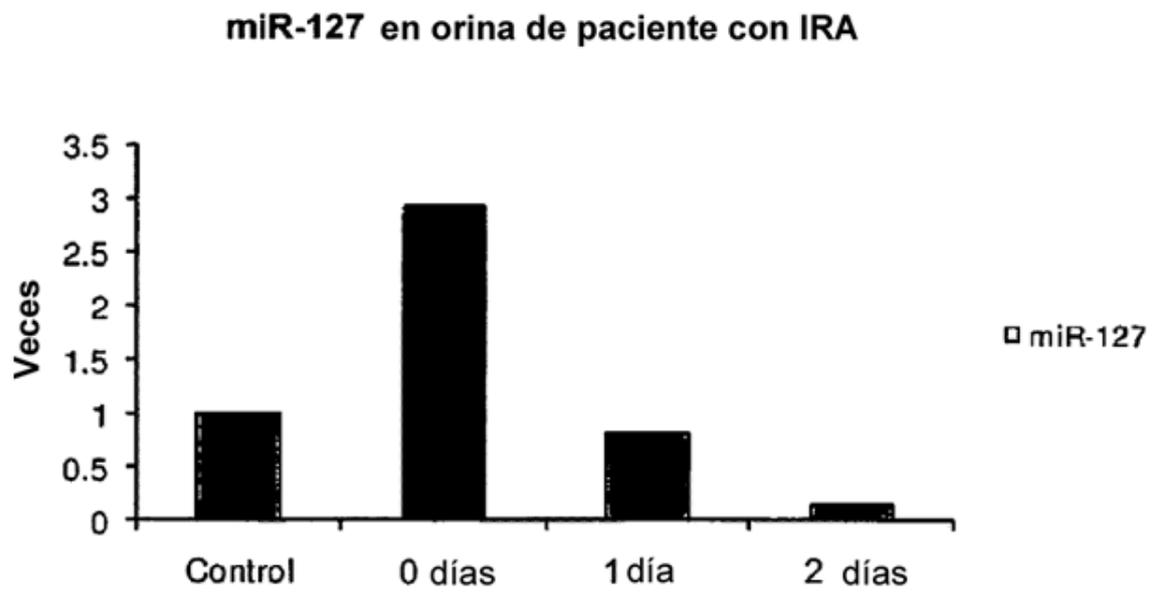


FIG. 13

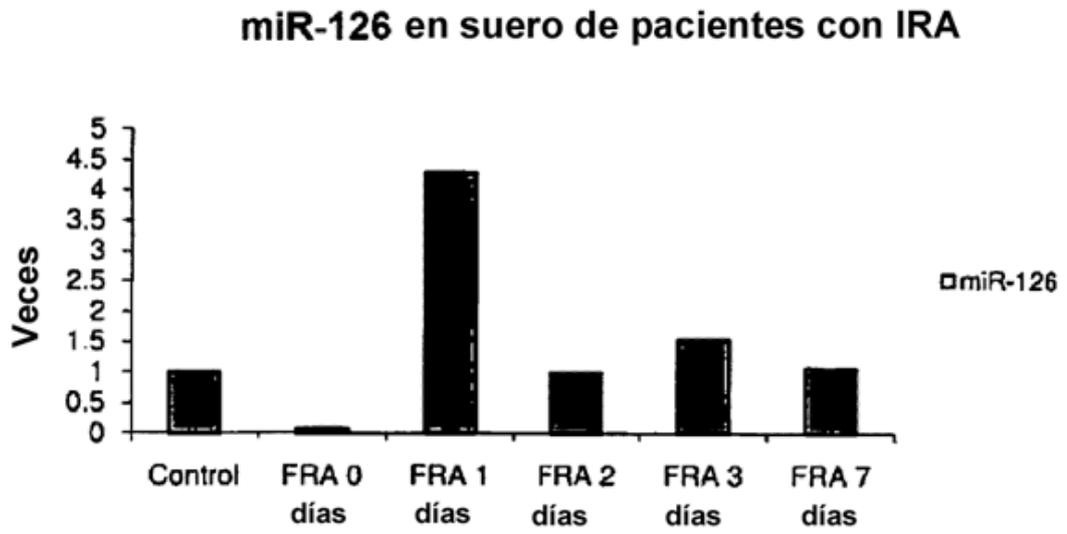


FIG. 14

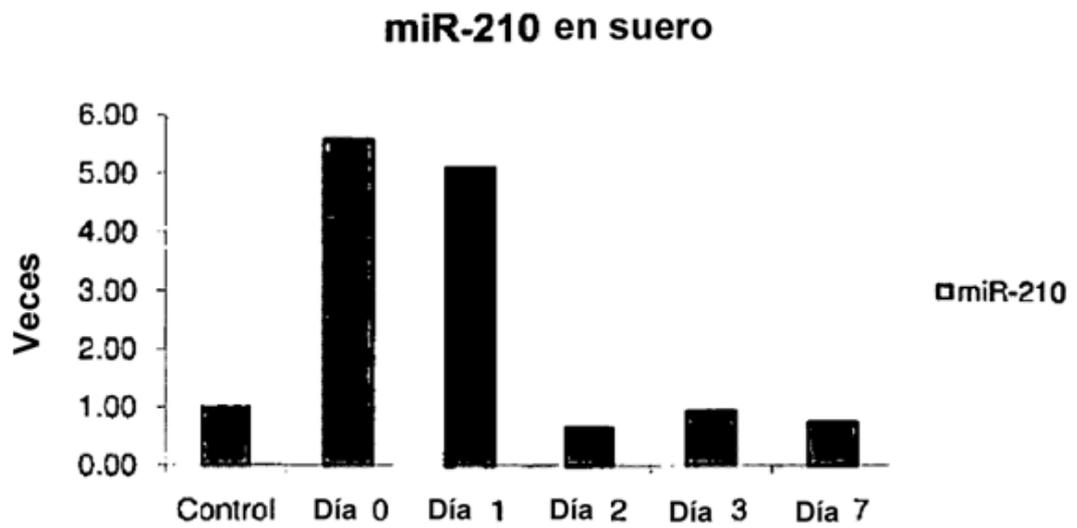


FIG. 15

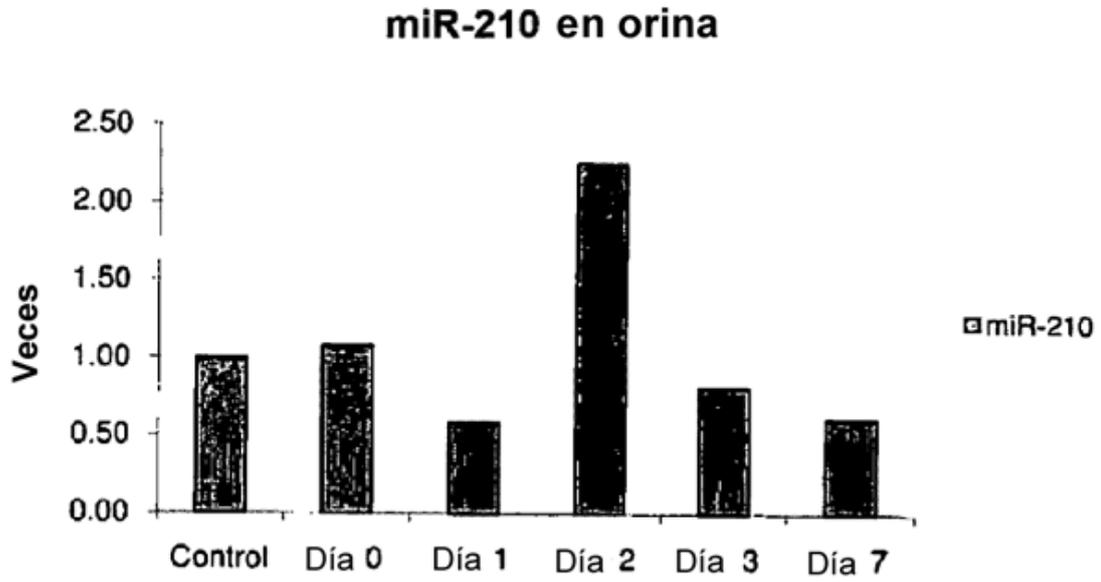


FIG. 16

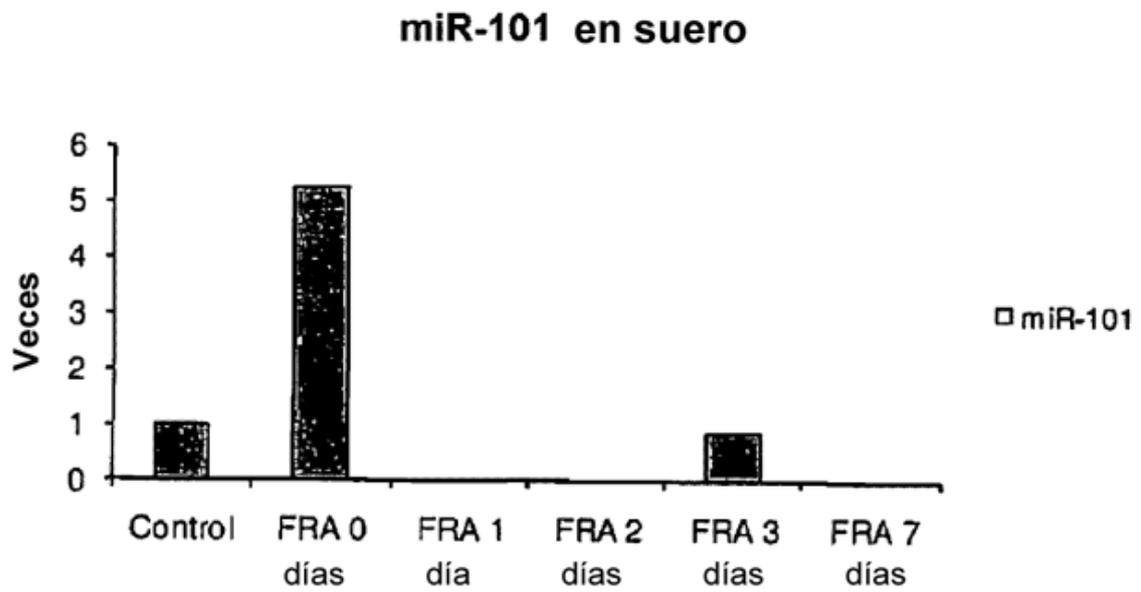


FIG. 17

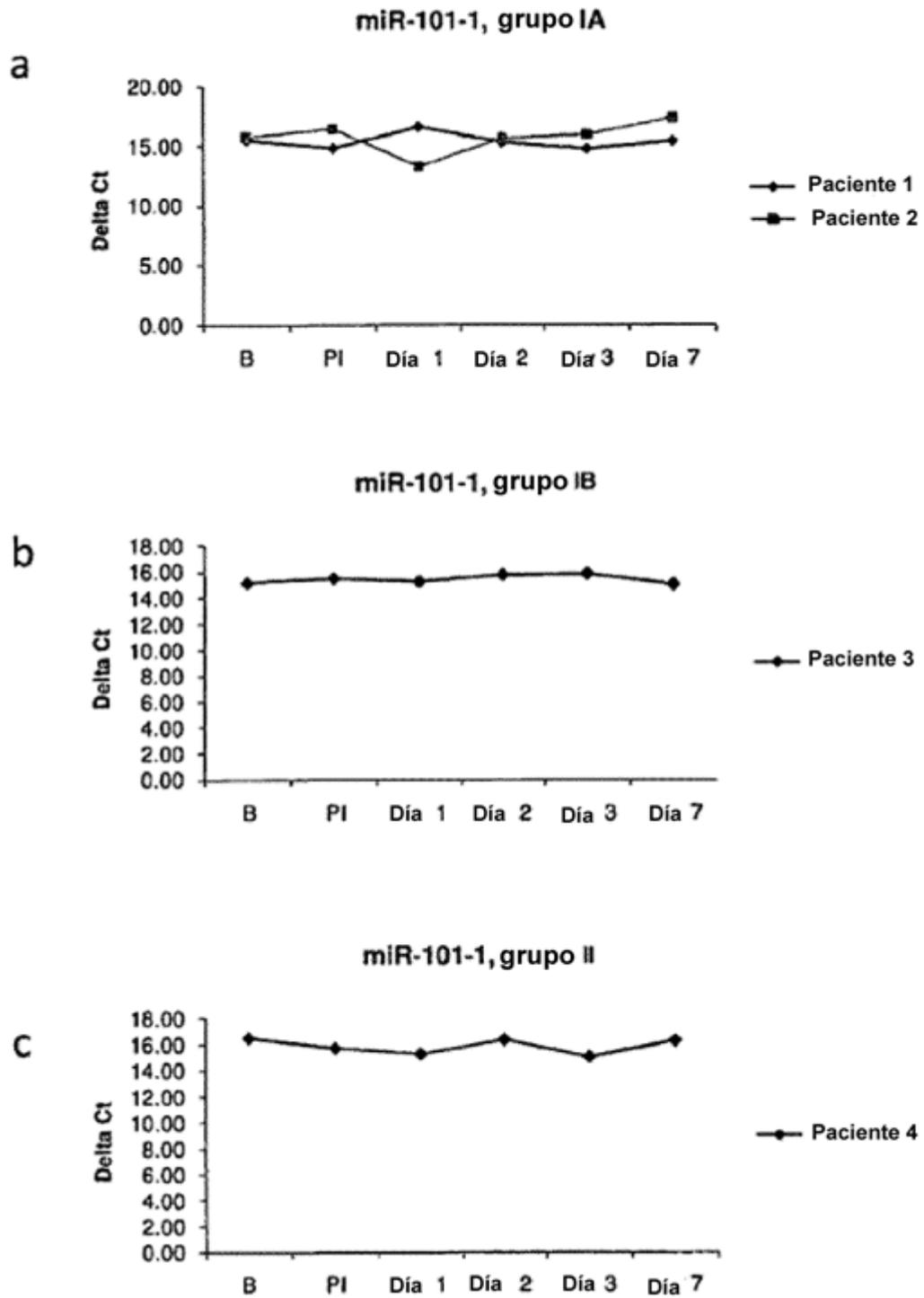
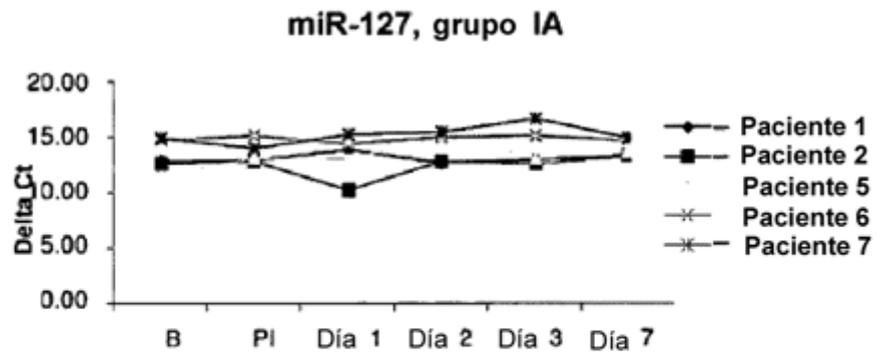
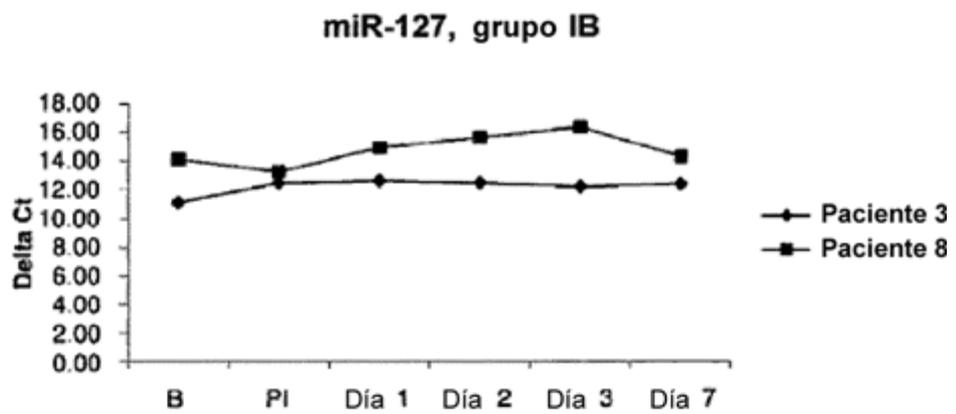


FIG. 18

a



b



c

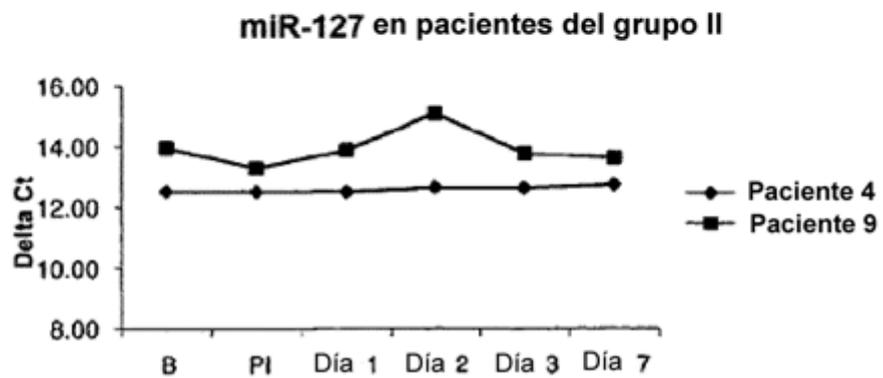
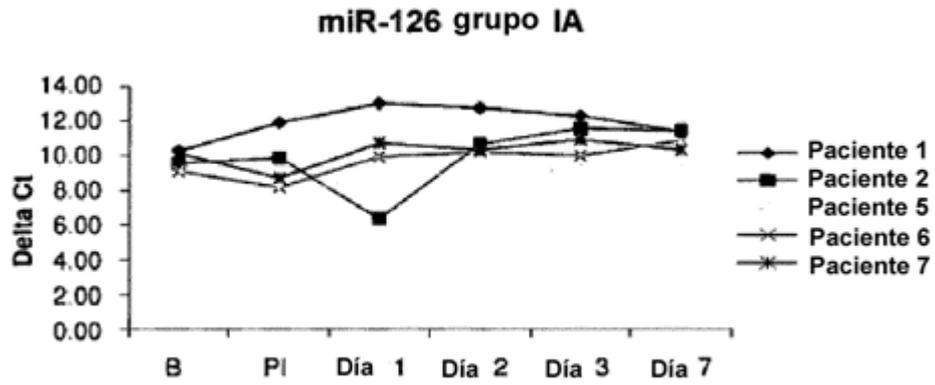
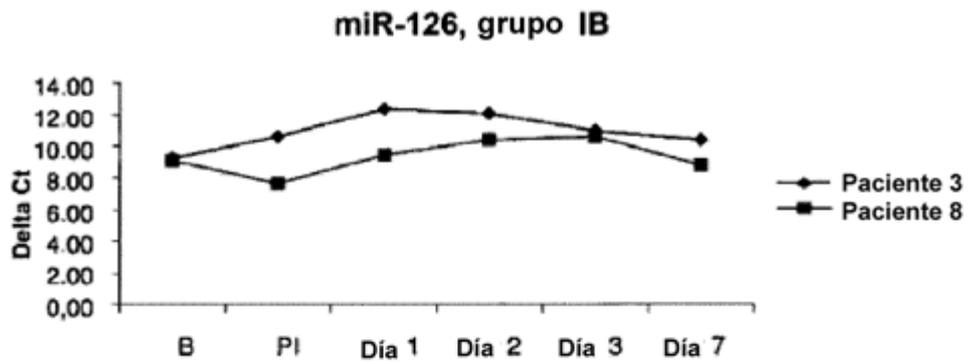


FIG. 19

a



b



c

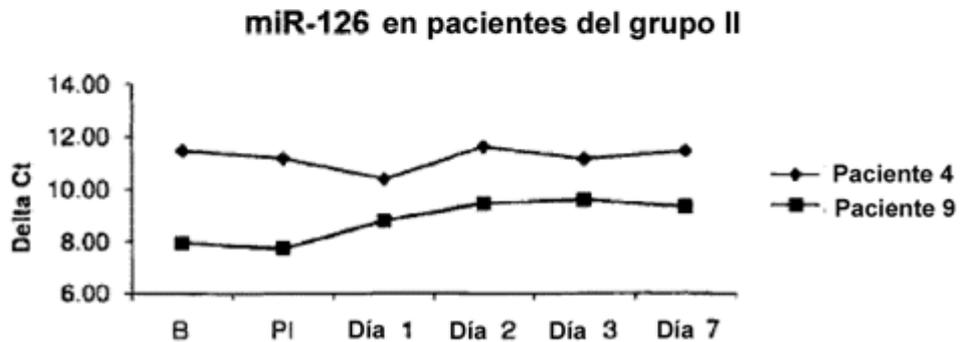
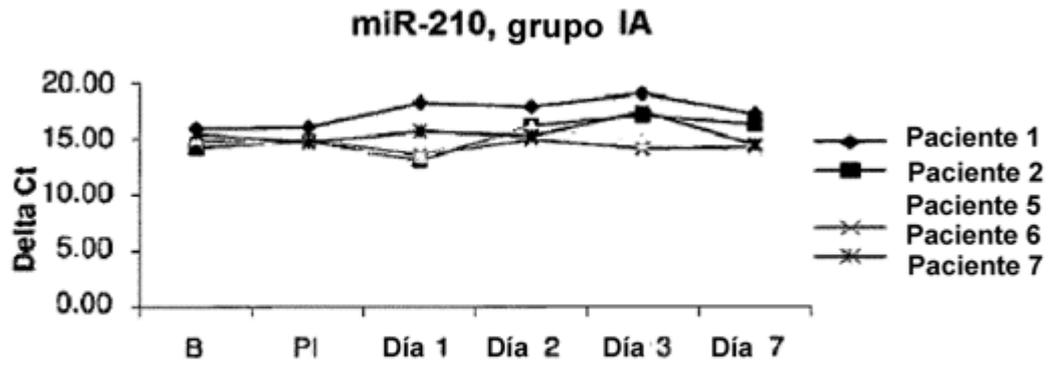
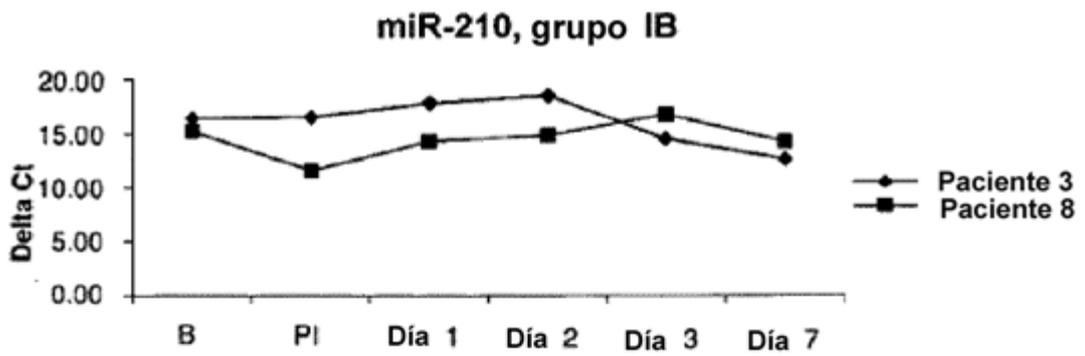


FIG. 20

a



b



c

