

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 565**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/70 (2006.01)

G01N 33/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2015 PCT/EP2015/053563**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15124707**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2015 E 15710439 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 3108259**

54 Título: **Diagnóstico in vitro y pronóstico de nefropatía inducida por contraste (nic) en pacientes sometidos a angiografía coronaria**

30 Prioridad:

20.02.2014 DE 102014102224
20.02.2014 EP 14156042

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2019

73 Titular/es:

IMMUNDIAGNOSTIK AG (100.0%)
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, DE

72 Inventor/es:

HOCHER, PROF. DR. BERTHOLD y
ARMBRUSTER, DR. FRANZ PAUL

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 714 565 T3

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

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico *in vitro* y pronóstico de nefropatía inducida por contraste (nic) en pacientes sometidos a angiografía coronaria

5

ÁREA DE LA INVENCION

La invención se refiere a medios de diagnóstico *in vitro* de orina y en particular a la determinación de la proteína de unión a la vitamina D urinaria.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

La lesión renal aguda (AKI) es una disminución repentina (desde horas a 7 días) de la función renal (Waikar SS et al, Diagnosis, epidemiology and outcomes of acute kidney injury, Clin J Am Soc Nephrol, 2008. 3(3): p. 844-61). AKI se ha convertido en una enfermedad nosocomial con una incidencia del 5% al 7% en pacientes hospitalizados en países desarrollados (Chertow GM et al., Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients, J Am Soc Nephrol, 2005. 16(11): p. 3365-70; Nash K. et al, Hospital-acquired renal insufficiency, Am J Kidney Dis, 2002, 39(5): p. 930-6; Uchino S et al., Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study, Jama, 2005. 294(7): p. 813-8). Esta incidencia parece estar aumentando con el tiempo (Hsu CY et al., Community-based incidence of acute renal failure, Kidney Int, 2007. 72(2): p. 208-12; Waikar SS et al., Declining mortality in patients with acute renal failure, 1988 a 2002. J Am Soc Nephrol, 2006. 17(4): p. 1143-50). AKI es una afección grave asociada a una mortalidad del 45% al 70% (Bagshaw SM et al., Prognosis for long-term survival and renal recovery in critically ill patients with severe acute renal failure: a population-based study, Crit Care, 2005. 9(6): p. R700-9; Liangos O et al., Epidemiology and outcomes of acute renal failure in hospitalized patients: a national survey, Clin J Am Soc Nephrol, 2006. 1(1): p. 43-51; Mehta RL et al, Acute renal failure definitions and classification: time for change? J Am Soc Nephrol, 2003. 14(8): p. 2178-87; Basile DP et al., Pathophysiology of acute kidney injury. Compr Physiol. 2(2): p. 1303-53]. Además del aumento de la mortalidad, AKI está asociada con una prolongación significativa de la estancia hospitalaria y altos costes financieros [Lattanzio MR et al, Acute kidney injury: new concepts in definition, diagnosis, pathophysiology, and treatment, J Am Osteopath Assoc, 2009. 109 (1): p. 13-9].

15

20

25

30

35

La patología renal es la causa más frecuente de la AKI y representa del 35% al 70% de los casos de AKI [Brivet FG et al., Acute renal failure in intensive care units--causes, outcome, and prognostic factors of hospital mortality; a prospective, multicenter study. French Study Group on Acute Renal Failure, Crit Care Med, 1996. 24 (2): p. 192-8; Liano F et al, Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group, Kidney Int, 1996. 50 (3): p. 811-8.]. La lesión isquémica o nefrotóxica del riñón con necrosis tubular aguda (ATN) posterior causa del 80% al 90% de la AKI debido a la etiología renal (Liano F et al., The spectrum of acute renal failure in the intensive care unit compared with that seen in other settings. The Madrid Acute Renal Failure Study Group, Kidney Int Suppl, 1998. 66: p. S16-24).

40

45

50

Durante la AKI, el aumento de la excreción urinaria de biomarcadores puede ser el resultado de la secreción tubular y la reabsorción defectuosa de los túbulos proximales debido a la disfunción de la megalina (Kuwabara T et al., Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons, Kidney Int, 2009. 75(3): p. 285-94; Wagener G et al., Increased incidence of acute kidney injury with aprotinin use during cardiac surgery detected with urinary NGAL, Am J Nephrol, 2008. 28(4): p. 576-82; Mahadevappa R et al., Megalin in acute kidney injury - foe and friend, Am J Physiol Renal Physiol. 2013: p. 6). En la AKI, algunos biomarcadores, como L-FABP y NGAL, son secretados en la orina por las células tubulares; sin embargo, estos también están presentes en el plasma en cantidades elevadas durante la AKI (Mishra J et al., Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery, Lancet, 2005. 365 (9466): p. 1231-8). Además, los medios de contraste causan un aumento de la vasoconstricción y una disminución de la vasodilatación en la médula renal, lo que lleva a la hipoxia e incluso a la necrosis tubular aguda conocida como nefropatía inducida por contraste (NIC) que tiende a ocurrir especialmente a menudo en diabéticos y pacientes con insuficiencia renal preexistente (Wong PC et al., Pathophysiology of contrast-induced nephropathy, Int J Cardiol. 158(2): p. 186-92).

55

Si bien hay biomarcadores conocidos que se correlacionan con la progresión de la enfermedad, no hay biomarcadores disponibles que sean predictivos de complicaciones que pongan en peligro la vida y de mortalidad causada por medios de contraste. La aplicación de nuevas tecnologías de análisis genómico (por ejemplo, sustracción de ARN o micromatrices de ADN) y enfoques proteómicos para identificar proteínas novedades que codifiquen la lesión renal están en curso pero no disponibles. Así, el estado de la técnica representa un problema.

60

RESUMEN DE LA INVENCION

Este problema se resuelve mediante un método de diagnóstico *in vitro* según la reivindicación 1. Realizaciones preferidas se describen en las reivindicaciones dependientes.

La presente solicitud se refiere a un método de diagnóstico de nefropatía inducida por medio de contraste (NIC) que comprende los pasos de i) tomar una muestra de orina de un paciente expuesto a la aplicación de medio de contraste, especialmente pacientes sometidos a angiografía coronaria; ii) evaluar el nivel de proteína de unión a la vitamina D (VDBP) en la muestra de orina obtenida en el paso (i); iii) relacionar el nivel urinario de proteína de unión a la vitamina D determinado en el paso (ii) a un nivel umbral preseleccionado, donde un nivel urinario de la proteína de unión a la vitamina D superior a dicho nivel umbral preseleccionado indica que el paciente está en riesgo de insuficiencia renal y que necesita un tratamiento de diálisis. El método reivindicado comprende además los pasos de evaluar adicionalmente el nivel de creatinina en la muestra de orina obtenida en el paso (i); calcular la relación VDBP urinaria a creatinina urinaria (uCr) y relacionarla a un nivel umbral preseleccionado, en el que un aumento de la relación VDBP/uCr indica que el paciente está en riesgo de insuficiencia renal y que necesita un tratamiento de diálisis.

En otra realización, la muestra de orina puede tomarse de un paciente con insuficiencia renal preexistente y/o expuesto a medios de contraste; y relacionar el nivel urinario de VDBP con una terapia renoprotectora. Esta realización puede comprender además una medición de la creatinina urinaria en el mismo y el cálculo de la relación de VDBP urinaria a creatinina urinaria. La presente solicitud se refiere al uso del nivel de VDBP urinaria o la relación VDBP/uCr urinaria como predictor de eventos renales adversos mayores (MARE). En consecuencia, el nivel de VDBP urinaria puede ser un biomarcador para ensayos preclínicos en pacientes con insuficiencia renal o insuficiencia cardíaca.

Otras realizaciones de la invención abarcan una determinación de KIM-1 y/o la TFG (tasa de filtración glomerular). El nivel urinario de VDBP se evalúa preferiblemente por inmunocromatografía de flujo lateral o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

Otras características, realizaciones y ventajas de la presente invención se expondrán o se harán evidentes a partir de la descripción detallada de la invención, los ejemplos representativos y las realizaciones de la invención y los dibujos que siguen. Los ejemplos dados no han de ser interpretados como una limitación al alcance de protección definido en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

Fig. 1 es un dibujo esquemático de la función de la megalina en la captación renal y la activación de 25-(OH)-vitamina D descrito en Nykjaer, A. et al., An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃, Cell, 1999.96(4): p. 507-15.

Fig. 2 es un dibujo esquemático y una línea temporal del estudio que conduce a la invención reivindicada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La nefropatía inducida por medios de contraste (NIC) se asocia con un aumento de la morbilidad y la mortalidad. Los inventores, por tanto, examinaron a 330 pacientes con diabetes mellitus o insuficiencia renal leve, los cuales fueron sometidos a angiografía coronaria. Se recogió sangre de esos pacientes 24 horas antes y después de la aplicación de medios de contraste. Después se realizó un seguimiento de los pacientes durante 90 días para eventos renales adversos mayores de punto final compuesto - MARE (MARE: necesidad de diálisis, duplicación de la creatinina sérica después de 90 días, rehospitalización de emergencia no planificada o fallecimiento).

Se encontró que las concentraciones urinarias de VDBP 24 horas después de la exposición a los medios de contraste eran predictivas de la necesidad de diálisis (sin diálisis: 423,8 ng/ml; n=319; necesidad de diálisis: 1006,0091 ng/ml, n=11; p <0,001), fallecimiento (sin fallecimiento durante el seguimiento: 334,7, n=322; fallecimiento durante el seguimiento: 401,3 ng/ml, n=8; p <0,003) y el MARE de punto final compuesto (sin MARE: 367,0 ng/ml, n=314; MARE: 733.4 ng/ml, n=16; p <0,001) durante el seguimiento de 90 días después de la exposición a los medios de contraste.

Cuando se corrigió para concentraciones urinarias de creatinina, los resultados siguen siendo significativos con niveles de significación similares. Así, la medición de VDBP urinaria demostró ser un convincente biomarcador de 90 días después de la exposición a los medios de contraste debido a la angiografía coronaria y su medición es una herramienta poderosa para el desarrollo de fármacos contra la insuficiencia renal aguda/NIC.

Sin desear estar limitado por una teoría, la proteína de unión a la vitamina D (VDBP) es una proteína de bajo peso molecular que se filtra a través del glomérulo en un complejo con 25-(OH)-vitamina D. El complejo de 25-(OH)-vitamina D y VDBP es captado por la megalina en el borde en cepillo de las células de los túbulos proximales. En el riñón normal, la VDBP se reabsorbe por endocitosis mediada por megalina y se cataboliza por las células epiteliales del túbulo proximal, lo que reduce la excreción urinaria a cantidades mínimas (Mahadevappa, R., et al., Megalin in acute kidney injury - foe and friend, Am J Physiol Renal Physiol. 2013: pag. 6.). Sin embargo, si las células tubulares se dañan, como ocurre durante la NIC, la reabsorción de VDBP mediada por la megalina específica de células tubulares puede estar ausente, ya que las células tubulares están disfuncionales o moribundas. Más en detalle, el portador de VDBP se degrada en los lisosomas, mientras que la 25-(OH)-vitamina D se convierte en 1,25-dihidroxi-vitamina D y

se vuelve a secretar en circulación (Figura 1). La necrosis tubular aguda (ATN) ya se produce durante la lesión de células epiteliales tubulares renales cuando el flujo sanguíneo renal disminuye a un nivel que resulta en un agotamiento de ATP celular severo, que a su vez conduce a una lesión celular aguda y a la disfunción. Ya que la captación de VDBP mediada por receptores consume energía, se espera que la lesión tubular resulte en la pérdida urinaria de VDBP (Doorenbos GR et al., Possible renoprotection by vitamin D in chronic renal disease: beyond mineral metabolism, Nat Rev Nephrol, 2009. 5(12): p. 691-700). Mientras que la tasa de filtración glomerular (TFG) puede diagnosticarse solo horas después de la lesión renal, se puede detectar un aumento de la concentración de VDBP tan pronto ocurre la ATN. Aún no se ha abordado específicamente si la VDBP está relacionada con daño tubulointersticial agudo y pronóstico de la lesión renal a largo plazo. A pesar de ello, la VDBP urinaria puede servir como un biomarcador de un daño renal agudo y la VDBP urinaria se incrementa con el aumento de la gravedad del daño renal y responde a la terapia de protección renoprotectora. El nivel de VDBP urinaria es, por lo tanto, un potencial predictor de incidentes adversos tales como como fallecimiento, inicio de diálisis, duplicación de la creatinina sérica, hospitalización no electiva, disminución del 25% de la TFG y desarrollo de nefropatía inducida por contraste (NIC) durante los 3 meses de seguimiento.

El papel como biomarcador de la VDBP urinaria también es único, lo que sugiere un nuevo mecanismo fisiológico, en comparación con los marcadores de daño tubular establecidos: molécula de lesión renal 1 (KIM-1), relación VDBP/creatinina urinaria (VDBP/uCr) y KIM-1/creatinina urinaria (KIM-1/uCr) en la cohorte de pacientes con insuficiencia renal preexistente, es decir, pacientes con creatinina plasmática de al menos 1,1 mg/dl o diabetes mellitus preexistente.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1 CURSO DEL ESTUDIO

El estudio prospectivo de cohorte en 327 pacientes consecutivos con angiografía coronaria se realizó entre enero de 2010 y diciembre de 2011 en el Departamento de Cardiología de la Charite - Universitätsmedizin Berlin. El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki, las Directrices europeas sobre buenas prácticas clínicas y los requisitos de las autoridades nacionales y regionales pertinentes y comités de ética. Se obtuvo consentimiento informado de cada participante antes de la participación en el estudio. Criterios de inclusión: se incluyeron en el estudio pacientes consecutivos con creatinina plasmática de al menos 1,1 mg/dl o diabetes mellitus preexistente. Criterios de exclusión: los pacientes con enfermedad renal en etapa terminal, así como los pacientes que no firmaron un consentimiento informado, fueron excluidos del estudio.

Con respecto a la Figura 2, después de la inscripción en el estudio, los pacientes se sometieron a primeros muestreos de sangre y orina para la obtención de valores basales. A continuación, se realizó un examen paraclínico con medios de contraste. En el presente estudio, solo se utilizó lobitridol, agente de contraste soluble en agua, no iónico, monomérico, de baja osmolaridad, a base de yodo, en una concentración de 350 mg yodo/ml (XENETIX® 350, Guerbet GmbH, Sulzbach/Taunus, Alemania). Además se obtuvieron muestras de sangre y orina 24 y 48 horas, y finalmente, 3 meses después de la infusión de agente de contraste.

Puntos finales del estudio fueron fallecimiento, inicio de diálisis, duplicación de la creatinina sérica, hospitalización no electiva y disminución del 25% de la tasa de filtración glomerular (TFG) durante los 3 meses de seguimiento. Además, se evaluaron las incidencias de nefropatía inducida por contraste (NIC) y evento renal adverso mayor (MARE). La NIC se definió como un aumento de la creatinina del 25% o 0,5 mg/dl desde el valor de inicial en 48 horas. La MARE se definió como un suceso de fallecimiento, inicio de diálisis o duplicación de la creatinina en el seguimiento.

El análisis estadístico se realizó con SPSS 20 (IBM® SPSS® Statistics IBM Cooperation, Armonk, EE.UU.). Las diferencias entre los biomarcadores se estimaron con test de Mann-Whitney-U para variables independientes o de Wilcoxon para las variables dependientes. Para todos los análisis, una $p < 0.05$ bilateral se consideró estadísticamente significativa.

EJEMPLO 2 TRATAMIENTO DE MUESTRA Y MEDICIÓN

Se congelaron las muestras a -80°C el mismo día. Antes de la congelación, se centrifugaron las muestras de sangre 5 minutos a 3000 rotaciones por minuto y solo se congeló el plasma. La creatinina se midió de acuerdo con el método de Jaffé. La TFG se estimó de acuerdo con la fórmula de la modificación de la dieta en la enfermedad renal (MDER). La cistatina C se midió mediante un método inmunonefelométrico utilizando partículas de poliestireno recubiertas con anticuerpos específicos contra cistatina c humana (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Alemania).

La VDBP humana se midió con un ELISA tipo sándwich disponible comercialmente (Immundiagnostik, número de catálogo K2314, Bensheim, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubó plasma

(diluido 1:40000) u orina (diluida 1:2-1:5 para los controles y 1:10-1:3000 para los otros grupos dependiendo de la concentración de VDBP) en una placa de microtitulación recubierta con anticuerpos policlonales anti-VDBP durante una hora. Posteriormente, se añadió un anticuerpo policlonal de detección anti-VDBP de conejo marcado con peroxidasa y se incubó durante una hora. Después del lavado, se añadió tetrametilbencidina como sustrato durante 15 minutos. Después de agregar una solución de parada, se midió la absorbancia a 450 nm con un espectrofotómetro (BenchMark Plus, Bio-Rad Laboratories, Veenendaal, Países Bajos). Se calcularon las concentraciones finales de VDBP usando una curva estándar generada con la proteína VDBP provista por el fabricante. El límite de detección de este ELISA es de 1,23 ng/ml; CV de intraensayo <5.0% para 16 determinaciones repetidas a concentraciones de 24,2 y 42,9 mg/dl y CV de interensayo <12,7% para una concentración de 19,3 mg/dl en 14 ensayos diferentes en dos lotes diferentes; rangos de recuperación del 85-116% y la linealidad fue aceptable ($r^2 = 0.998$). La VDBP de rata se midió utilizando otro kit ELISA disponible en el mercado (Alpco, Salem, NH) siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite de detección según lo establecido por el fabricante: 3,125 ng/ml, rango 3,125-100 ng/ml. La excreción de VDBP se calculó a partir de la concentración de VDBP en la orina recogida durante un período de 24 horas (Mirkovic, K., et al., Urinary vitamin D binding protein: a potential novel marker of renal interstitial inflammation and fibrosis, PLoS One. 8 (2): p. e55887).

Para la medición de la molécula de lesión renal 1 (KIM-1) en orina, se usó un KIM-1 KIT DE PRUEBA ELISA para la detección de KIM-1 en humanos (BioAssay Works®, L.L.C., Ijamsville, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante (Vaidya VS et al., A rapid urine test for early detection of kidney injury, Kidney Int, 2009. 76(1): p. 108-14). Los niveles de detección de antígeno Kim-1 en la orina superiores a 800 pg/ml se realizaron con una relación de dosis-respuesta que cubre un rango tres-log.

EJEMPLO 3 ANÁLISIS

Características de los pacientes. Se incluyeron en el estudio un total de 327 pacientes consecutivos sometidos a angiografía coronaria (239 (76,1%) hombres y 75 (23,9%) mujeres) con una mediana de edad de 68,89 ± 9,69 años y un índice de masa corporal (IMC) de 28,99 ± 5,44 kg/m². 169 pacientes (53,8%) fueron diagnosticados previamente con diabetes mellitus, 81 (25,8%) sufrieron insuficiencia cardíaca congestiva y 86 (27,4%) tuvieron anemia. El volumen promedio del medio de contraste inyectado fue de 112,33 ± 55,24 ml. Los promedios urinarios de VDBP y KIM-1 de la cohorte completa al ingreso al estudio fueron 12,80 ± 3515,23 y 0,161 ± 0,19 respectivamente. Además, se calcularon las relaciones VDBP/creatinina urinaria (VDBP/uCr) y KIM-1/ creatinina urinaria (KIM-1/uCr), así como la TFG, y se encontraron al nivel basal de 1,72 ± 1008,42; 0,026 ± 0,02 y 64,06 ± 21,05 respectivamente (Tabla 1).

TABLA 1

Características de los pacientes al inicio.

Características de los pacientes	N	314
Mujer (%) / Hombre (%)	75 (23,9%) / 239 (76,1%)	
Edad (ME ± SD)	Años	68,89 (± 9,69)
Índice de masa corporal (ME ± SD)	kg/m ²	28,99 (± 5,44)
Volumen MC (ME ± SD)	ml	112,33 (± 55,24)
Creatinina plasmática basal (ME ± SD)	mg/dl	1,24 (± 0,43)
TFG basal (ME ± SD)	ml/min/1,73m ²	64,06 (± 21,05)
Diabetes mellitus (%)	169 (53,8%)	
Insuficiencia cardíaca congestiva (%)	81 (25,8%)	
Anemia (%)	86 (27,4%)	

MC: medio de contraste, VDBP: proteína de unión a la vitamina D, KIM-1: molécula de lesión renal 1, uCr: creatinina urinaria, NIC: nefropatía inducida por contraste, TFG: tasa de filtración glomerular estimado con la fórmula MDER, ME: media, M: mediana, SD: desviación estándar

EJEMPLO 4 COMPARACIÓN Y CORRELACIÓN ENTRE VDBP Y KIM-1 Y LOS PUNTOS FINALES DEL ESTUDIO

5 Ocho pacientes fallecieron durante el tiempo de seguimiento de 90 días. El fallecimiento ocurrió a una mediana de 74,5 (7 - 95) días después del ingreso al estudio. Las causas de fallecimiento fueron enfermedades cardiovasculares en 4 pacientes, infecciones en 2 pacientes, insuficiencia respiratoria en 1 paciente y otros motivos desconocidos en 1 paciente; Véase la Tabla 2 a continuación.

TABLA 2

10 Tiempo hasta el fallecimiento y causas del fallecimiento durante el seguimiento.

ID paciente	Días desde la inclusión en el estudio hasta el fallecimiento	Causa del fallecimiento
19	7	Desconocido
29	90	Bradiarritmia con asistolia
42	84	Insuficiencia respiratoria
124	79	Insuficiencia cardíaca aguda descompensada
133	26	Septicemia
149	95	Muerte cardíaca súbita
164	70	Septicemia y endocarditis infecciosa
276	48	Embolia pulmonar aguda con insuficiencia cardíaca aguda descompensada

15 Los niveles medianos de VDBP fueron significativamente más bajos en los supervivientes ($12,7 \pm 2650,5$ ng/ml) en comparación con los pacientes fallecidos ($188,0 \pm 520,4$ ng/ml; $p = 0,003$). La relación VDBP/uCr calculada confirmó esta diferencia significativa, ya que fue de $1,71 \pm 349,0$ ng/ml/mmol/L en pacientes que permanecieron con vida al final del seguimiento en comparación con $16,45 \pm 286,2$ ng/ml/mmol/L en aquellos que no sobrevivieron ($p = 0,004$). KIM-1 y KIM-1/uCr urinarios no difirieron entre los supervivientes y los no sobrevivientes 24h después de la inyección de MC; véase la Tabla 3 a continuación:

TABLA 3

20 Correlación entre la concentración urinaria de VDBP y KIM-1 24 hrs. después de la inyección de MC y el suceso de los puntos finales del estudio

VDBP				KIM-1			
	M	SD	p	M	SD	p	
Cohorte completa	12,8	3515,2		0,16	0,192		
CIN	No	11,5	3793,6	0,032	0,16	0,195	0,912
	Si	29,5	1326,7		0,19	0,119	

Fallecimiento	Vivo	12,7	2650,5	0,003	0,16	0,191	0,181
	Muerto	188,0	520,4		0,22	0,230	
Diálisis	No	12,6	2640,0	<0,001	0,16	0,189	0,382
	Si	125,7	1796,6		0,21	0,350	
Hospitalización no electiva	No	12,3	2853,3	0,140	0,16	0,186	0,729
	Si	19,7	453,4		0,15	0,256	
MARE	No	11,4	2961,1	<0,001	0,16	0,175	0,146
	Si	107,5	1526,6		0,22	0,321	
Descenso de la TFG en 25% (90 días)	No	11,6	3055,2	0,624	0,16	0,183	0,032
	Si	12,3	29,8		0,13	0,248	

VDBP: proteína de unión a la vitamina D, KIM-1: molécula de lesión renal 1, NIC: nefropatía inducida por contraste, MARE: evento renal adverso mayor, TFG: tasa de filtración glomerular estimada con la fórmula MDER, N: número de pacientes, M: mediana, SD: desviación estándar, p: significación según la prueba de Mann-Whitney-U.

5 Se detectó deterioro de una función renal, medida por una disminución del 25% de la TFG, en 19 pacientes. Se correlacionó significativamente solo con el aumento de KIM-1 en orina ($0,16 \pm 0,183$ ml/min/1,73m² frente a $0,13 \pm 0,248$ ml/min/1,73m², $p = 0,032$). Se diagnosticó NIC en 21 pacientes de nuestra población de estudio. Tanto VDBP como VDBP/uCr fueron, 24 horas después de la inyección de MC, significativamente mayores en pacientes con NIC (29,5 ± 1326,7 ng/ml y 2,64 ± 185,9 ng/ml/mmol/L frente a 11,5 ± 3793,6 ng/ml y 1,65 ± 1096,5 ng/ml/mmol/L respectivamente).

15 11 pacientes de la cohorte tuvieron que someterse a diálisis durante el período de seguimiento. Tanto VDBP como VDBP/uCr fueron, 24 horas después de la inyección de MC, factores predictivos significativos de la necesidad de diálisis, ya que sus valores fueron significativamente más altos en pacientes que necesitaron tratamiento de diálisis posteriormente ($125,7 \pm 1796,6$ ng/ml y $37,0 \pm 345,2$ ng/ml/mmol/L frente a $12,6 \pm 2640,0$ ng/ml y $1,69 \pm 345,6$ ng/ml/mmol/L respectivamente). Solo el aumento de KIM-1/uCr urinaria pero no de KIM-1 urinaria en solitario predijo significativamente la necesidad de diálisis posteriormente ($0,04 \pm 0,039$ ng/ml/mmol/L frente a $0,03 \pm 0,020$ ng/ml/mmol/L; $p = 0,001$).

20

TABLA 4

Correlación entre VDBP/uCr y KIM-1/uCr 24 horas después de la inyección de CM y el suceso de los puntos finales del estudio

VDBP/uCr				KIM-1/uCr			
	M	SD	p	M	SD	p	
Cohorte completa				1,72	1008,4	0,03	0,022
NIC	No	1,65	1096,5	0,038	0,03	0,024	0,534
	Si	2,64	185,9		0,03	0,016	
Fallecimiento	Vivo	1,71	349,0	0,004	0,03	0,022	0,121
	Muerto	16,45	286,2		0,04	0,039	

Diálisis	No	1,69	345,6	<0,001	0,03	0,020	0,001
	Si	37,00	345,2		0,04	0,052	
Hospitalización no electiva	No	1,54	377,0	0,046	0,02	0,021	0,014
	Si	3,32	119,0		0,03	0,031	
MARE	No	1,40	387,3	<0,001	0,02	0,020	0,002
	Si	16,45	301,8		0,04	0,047	
Descenso de la TFG en 25% (90 días)	No	1,53	401,9	0,985	0,02	0,020	0,526
	Si	2,23	10,0		0,03	0,041	

VDBP: proteína de unión a la vitamina D, KIM-1: molécula de lesión renal 1, uCr: creatinina urinaria, NIC: nefropatía inducida por contraste, MARE: evento renal adverso mayor, TFG: tasa de filtración glomerular estimada con la fórmula MDER, N: número de pacientes, M: mediana, SD: desviación estándar, p: significación según la prueba de la U de Mann-Whitney

5

El suceso acumulado de los eventos renales adversos mayores (MARE) definidos como el suceso de fallecimiento, el inicio de diálisis o la duplicación de la creatinina sérica en el seguimiento observado en 16 pacientes de nuestra población de estudio, fue predicha por niveles significativamente más altos tanto de VDBP como VDBP/uCr tan pronto como a las 24 horas después de la inyección de MC ($107,5 \pm 1526,6$ ng/ml y $16,45 \pm 301,8$ ng/ml/mmol/L frente a $11,4 \pm 2961,1$ ng/ml y $1,40 \pm 387,3$ ng/ml/mmol/L respectivamente). El aumento de la relación KIM-1/uCr urinaria, pero no la KIM-1 urinaria en solitario fue un predictor de MARE ($0,04 \pm 0,047$ ng/ml/mmol/L frente a $0,02 \pm 0,020$ ng/ml/mmol/L; $p = 0,002$).

10

15

TABLA 5

Significación de biomarcadores medidos como predictores de eventos renales

	VDBP	Relación VDBP/uCr	KIM-1	Relación KIM-1/uCr
NIC	+	+		
Fallecimiento	++	++		
Diálisis	+++	+++		++
Hospitalización no electiva		+		+
MARE	+++	+++		++
Descenso de la TFG en 25% (90 días)			+	

VDBP: proteína de unión a la vitamina D, KIM-1: molécula de lesión renal 1, uCr: creatinina urinaria, NIC: nefropatía inducida por contraste, MARE: evento renal adverso mayor, TFG: tasa de filtración glomerular, +: significativo con $p < 0,05$, ++: significativo con $p < 0,01$, +++: significativo con $p < 0,001$

20

Además, evaluamos la correlación entre la hospitalización no electiva durante los 90 días de seguimiento y VDBP urinaria, KIM-1 urinaria, VDBP/uCr y KIM-1/uCr. El análisis estadístico reveló que los niveles de VDBP/uCr 24 horas después de la inyección de MC fueron significativamente más altos en los pacientes que necesitaron hospitalización no electiva durante los 90 días de seguimiento ($3,32 \pm 119,0$ ng/ml/mmol/L frente a $1,54 \pm 377,0$ ng/ml/mmol/L; $p = 0,046$). Esta correlación fue cierta también para la relación KIM-1/uCr ($0,03 \pm 0,031$ ng/ml/mmol/L frente a $0,02 \pm 0,021$ ng/ml/mmol/L; $p = 0,014$).

Por lo tanto, el estudio demuestra que la VDBP urinaria es un biomarcador de daño tubulointersticial inducido por medio de contraste, independiente de la TFG y KIM-1, en pacientes con insuficiencia renal preexistente. VDBP y VDBP/uCr fueron fuertes predictores de fallecimiento, diálisis, NIC y MARE, y por lo tanto ejercieron mejor que la relación KIM-1/uCr, que solo podía predecir diálisis y MARE, y también mejor que KIM-1 en solitario, que solo se asoció significativamente con una disminución del 25% de la TFG durante los 90 días de seguimiento. Además, VDBP/uCr y KIM-1/uCr se asociaron significativamente con la hospitalización no electiva durante el seguimiento (Tabla 5).

Los resultados son coherentes con informes anteriores sobre la pérdida urinaria de VDBP en el establecimiento del daño renal en un modelo de rata de nefrotoxicidad inducida por adriamicina (Malard V et al., Urine proteomic profiling of uranium nephrotoxicity, *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1794(6): p. 882-91), así como en el contexto de la enfermedad renal crónica en humanos (Thraill KM et al., Enhanced excretion of vitamin D binding protein in type 1 diabetes: a role in vitamin D deficiency?, *J Clin Endocrinol Metab*. 96(1): página 142-9; Doorenbos CR et al., Antiproteinuric treatment reduces urinary loss of vitamin D-binding protein but does not affect vitamin D status in patients with chronic kidney disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 128(1-2): p. 56-61). Curiosamente, tanto VDBP urinaria como KIM-1 urinaria (van Timmeren MM et al., Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease, *J Pathol*, 2007. 212 (2): p. 209-17) se asociaron con inflamación intersticial independientemente de la albuminuria, lo que hace que la VDBP sea aún más interesante como candidato a biomarcador.

Anteriormente se había demostrado que la VDBP urinaria aumentaba con el aumento de la gravedad del daño renal y respondía a la terapia renoprotectora, pero seguía siendo 100 veces mayor en comparación con los sujetos sanos normoalbuminúricos. Además, la VDBP urinaria es aproximadamente 4 veces mayor en pacientes diabéticos con normoalbuminuria. Estos hechos sugieren que el daño tubulointersticial, considerado la ruta común final hacia la enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), está presente en la etapa asintomática temprana y persiste en gran medida a pesar del mejor tratamiento médico disponible en la actualidad. En efecto, La VDBP urinaria se elevó de manera marcada y consecuente en ratas con nefropatía inducida por adriamicina en una etapa muy temprana, antes incluso de que se pudieran detectar biomarcadores prefibróticos. Además, el aumento de VDBP urinaria se asoció notablemente con marcadores de fibrosis tubulointersticial después de la inducción de nefrosis, lo que sugiere que no solo la sobrecarga proteínica del complejo de megalina desempeña un papel en la pérdida urinaria de VDBP, sino que también células epiteliales tubulares dañadas en áreas de fibrosis tubulointersticial pierden su capacidad para gestionar la endocitosis mediada por receptores de VDBP, lo que resulta en una mayor excreción urinaria de VDBP.

El aumento del nivel de VDBP urinaria demostró ser, en nuestro estudio, un predictor de mortalidad por todas las causas. Hasta donde sabemos, no hay datos a día de hoy sobre la asociación entre la VDBP urinaria y la mortalidad en la literatura. Sin embargo, en varios estudios, las concentraciones plasmáticas de vitamina D se asociaron con tasas de mortalidad más altas (Leaf DE et al., Dysregulated mineral metabolism in patients with acute kidney injury and risk of adverse outcomes, *Clin Endocrinol (Oxf)*. 79(4): p. 491-8; Trummer O et al., Vitamin D and mortality: a Mendelian randomization study, *Clin Chem*. 59(5): p. 793-7).

KIM-1 es una superfamilia de receptores transmembrana de inmunoglobulina que se expresa en los túbulos en el contexto de la lesión renal y facilita la eliminación de los cuerpos apoptóticos y necróticos. La administración de medicamentos y alimentos de EE.UU. aprobó KIM-1 como uno de los biomarcadores urinarios en un panel de ensayos preclínicos. Sin embargo, un ensayo clínico reciente en una cohorte de 700 pacientes adultos en estado crítico reportó que la KIM-1 urinaria solo puede predecir la lesión renal aguda al mismo tiempo que se produjera el aumento de los niveles de creatinina en suero por primera vez (de Geus, HR, et al., Time of injury affects urinary biomarker predictive values for acute kidney injury in critically ill, non-septic patients, *BMC Nephrol*. 14(1): p. 273). Estos datos están en línea con nuestros resultados, que muestran una correlación entre el aumento de KIM-1 urinaria y la disminución del 25% de la TFG. Un número de estudios informaron de que la KIM-1 urinaria no se asoció significativamente a la lesión renal aguda en adultos o niños (Parikh, C.R, et al., Performance of kidney injury molecule-1 and liver fatty acid-binding protein and combined biomarkers of AKI after cardiac surgery, *Clin J Am Soc Nephrol*. 8(7): p. 1079-88; Kwon, S.H., et al., KIM-1 expression predicts renal outcomes in IgA nephropathy, *Clin Exp Nephrol*. 17(3): p. 359-64). Verbrugge et al. mostraron en su estudio en pacientes con insuficiencia cardíaca descompensada aguda que la KIM-1 urinaria no es un predictor fiable de insuficiencia renal persistente o mortalidad por todas las causas. Al mismo tiempo, la relación KIM-1/uCr puede ser valiosa para la detección de lesión renal.

5 Dados los inconvenientes de presentar las concentraciones absolutas de biomarcadores urinarios, como la oliguria que causa un aumento en la concentración absoluta de un biomarcador, y poliuria como un motivo de su disminución, normalizar la concentración de un biomarcador urinario respecto a la creatinina urinaria tiene en cuenta las diferencias en la tasa de flujo urinario. Sin embargo, al normalizar, la tasa de excreción de creatinina por el riñón también tiene
10 que ser tomada en consideración. En condiciones no estables como la insuficiencia renal aguda, la excreción urinaria de creatinina cambia con el tiempo. Si el biomarcador evaluado se comporta exactamente igual que la creatinina en términos de filtración, secreción y reabsorción (Waikar SS et al., Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate, *Kidney int.* 78(5): p. 486-94), el nivel normalizado se verá afectado por las diferencias en excreción urinaria de creatinina, como se ve en nuestros resultados comparando valores predictivos de VDBP y KIM-1 en solitario frente a VDBP/uCr y KIM-1/uCr.

15 En resumen, se demostró que VDBP y VDBP/uCr urinarias son potentes biomarcadores de desenlace de 90 días después de la exposición a los medios de contraste, por ejemplo, debido a la angiografía coronaria, y por lo tanto son herramientas útiles para el desarrollo de fármacos contra la insuficiencia renal aguda/NIC. KIM-1/uCr urinaria es además un buen predictor de incidentes renales adversos mayores y diálisis.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de diagnóstico in vitro de un riesgo de nefropatía inducida por medio de contraste (NIC) que comprende los pasos de
- 5 i) tomar una muestra de orina de un paciente que se expondrá a la aplicación de medios de contraste;
 - 10 ii) evaluar el nivel de proteína de unión a la vitamina D (VDBP) en la muestra de orina obtenida en el paso (i);
 - 10 iii) relacionar el nivel de proteína de unión a la vitamina D urinaria determinado en el paso (ii) a un nivel umbral preseleccionado,
 - 15 (iv) evaluar adicionalmente el nivel de creatinina en la muestra de orina obtenida en el paso (i);
 - 15 (v) calcular la relación de VDBP urinaria a creatinina urinaria (uCr) y relacionarla a un nivel umbral preseleccionado,
- 15 en el que un nivel de proteína de unión a vitamina D urinaria mayor que dicho nivel umbral preseleccionado y una relación VDBP/uCr incrementada indica que el paciente está en riesgo de insuficiencia renal y con necesidad de tratamiento de diálisis.
- 20 2. Método de diagnóstico según la reivindicación 1, en el que la muestra de orina se toma de un paciente que será sometido a angiografía coronaria.
- 20 3. Método de diagnóstico según la reivindicación 1, en el que la muestra de orina se toma de un paciente con insuficiencia renal preexistente.
- 25 4. Método de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en un método para monitorizar una terapia renoprotectora, en el que el nivel de VDBP urinaria o la relación urinaria VDBP/uCr es un factor predictivo de eventos renales adversos mayores (MARE).
- 30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el nivel de VDBP urinaria es un biomarcador para ensayos preclínicos en pacientes con insuficiencia renal o cardíaca.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además una determinación de KIM-1 y/o TFG (tasa de filtración glomerular).
- 35 7. Método según las reivindicaciones 1 a 6, en el que el nivel de VDBP urinaria se evalúa mediante inmunocromatografía de flujo lateral.
- 40 8. Método según las reivindicaciones 1 a 7, en el que el nivel de VDBP urinaria se evalúa mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

Fig. 1

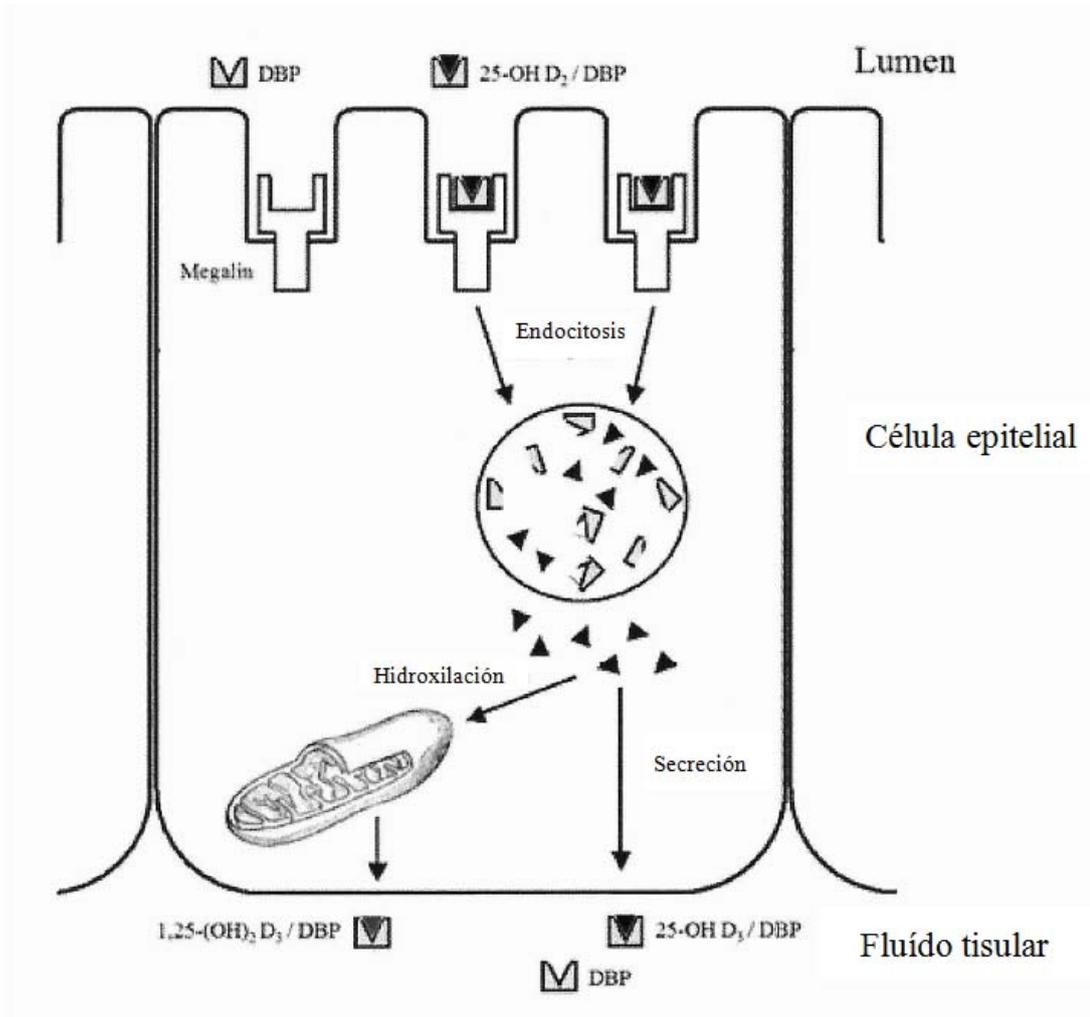


Fig. 2

