

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 731**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2009 E 16191697 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3141904**

54 Título: **Métodos, dispositivos y kits para detectar o monitorizar la lesión renal aguda**

30 Prioridad:

21.11.2008 US 116713 P

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

04.07.2019

73 Titular/es:

**FUTURE MEDICAL DIAGNOSTICS CO., LTD
(100.0%)
Floor 3, Building 4, No. 892 Wusong Road Guo
Xiang Residential District Wuzhong Economic
and Technological Development Zone
Suzhou, Jiangsu Province, CN**

72 Inventor/es:

VENGE, PER

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 718 731 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

Métodos, dispositivos y kits para detectar o monitorizar la lesión renal aguda

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a un método para determinar el origen de la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (LAGN), también conocida como lipocalina neutrófila humana (LNH) basado en la determinación de la forma monomérica y las diversas formas heteroméricas de la LAGN.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La lesión renal aguda (LRA) es una afección grave que puede producirse de forma posoperatoria, por ejemplo, como una complicación de una cirugía cardíaca o un trasplante de riñón, como un efecto secundario de la introducción in vivo de agentes de diagnóstico, por ejemplo, agentes de contraste para rayos X o agentes terapéuticos nefrotóxicos, y similares, y/o en conexión con otras afecciones médicas, por ejemplo, diabetes, septicemia, shock hemorrágico y similares. Como ejemplo, la lesión renal aguda puede producirse en hasta el 30 % de todos los pacientes que se someten a cirugía cardíaca y está asociada a una mortalidad alta, una evolución hospitalaria más complicada, dependencia de diálisis, calidad de vida reducida y un mayor riesgo de complicaciones infecciosas. A pesar de que la introducción de terapia en etapas tempranas de la insuficiencia renal aguda ha demostrado reducir la tasa de mortalidad y/o acortar los regímenes de tratamiento, a menudo ha resultado difícil detectar la insuficiencia renal aguda en etapas tempranas.

En la práctica clínica actual, el diagnóstico estándar de la LRA se denomina RIFLE (riesgo, lesión, falla, pérdida, enfermedad renal terminal), por su acrónimo en inglés, el cual está basado en la elevación de la creatinina en suero o en la reducción de la producción de orina. La creatinina en suero es un marcador fiable de la función renal general, pero es un indicador no fiable y retardado durante cambios agudos en la función renal. Afortunadamente, se han descubierto varios biomarcadores novedosos prometedores, incluyendo la LNH/LAGN (en lo sucesivo denominada LAGN), la molécula de lesión renal 1, la cistatina C y la IL-18.

30

Se ha prestado mucha atención al uso de la proteína LAGN como marcador para la lesión renal aguda. La LAGN es una glicoproteína y se identificó originalmente como un componente granular específico de los neutrófilos y miembro de la familia de proteínas lipocalinas. Se demostró que la proteína existe como un monómero de 25 kDa y como un homodímero con enlaces disulfuro de 45 kDa, y también puede complejarse covalentemente con la gelatinasa de neutrófilos (también conocida como metaloproteínasa de la matriz 9, MMP-9) a través de un puente disulfuro intermolecular como una forma heterodimérica de 135 kDa. La LAGN fue descrita por primera vez como LNH como un marcador específico de la actividad de los neutrófilos in vivo e in vitro por Xu y col., *Journal of Immunological Methods*, 171:245-252 (1994), y para uso como marcador de diagnóstico para la inflamación por Venge, patente de EE. UU. n.º 6.136.526, que se incorpora en el presente documento por referencia.

40

Más recientemente, Devarajan y col., patentes de EE. UU. con n.º de publicación 2004/0219603 A1 y 2005/0272101 A1, desvelan el uso de la LAGN como biomarcador para lesión de las células tubulares renales y otras enfermedades y lesiones renales. BioBort Diagnostics, Gentofte, Dinamarca, ofreció recientemente un kit de ELISA para la determinación de LAGN "NGAL ELISA kit" para el diagnóstico temprano de la insuficiencia renal aguda, así como un anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano contra la LAGN y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-rata contra la LAGN. Asimismo, Dent y col., *Critical Care*, 11 (6): R127 (2007).), describen el dispositivo Triage® NGAL de Biosite Inc., San Diego, CA, que emplea un anticuerpo monoclonal específico de la LAGN conjugado a una nanopartícula fluorescente, para uso en la medición de LAGN como biomarcador de la lesión renal aguda.

50 RESUMEN DE LA INVENCION

La invención está dirigida a métodos para determinar un origen de la proteína lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (LAGN) en una muestra de un individuo. En una forma de realización más específica, los métodos pueden usarse para distinguir entre LAGN que procede del riñón y LAGN que procede de neutrófilos. En una forma de realización específica, tales métodos comprenden (a) determinar las cantidades relativas de las formas monomérica, dimérica y heterodimérica de la proteína LAGN en la muestra, y (b) comparar las cantidades determinadas, donde una cantidad predominante de proteína LAGN monomérica y/o heterodimérica en comparación con la proteína LAGN dimérica indica proteína LAGN que procede del riñón del individuo, mientras que una cantidad igual o predominante de proteína LAGN dimérica en comparación con la proteína LAGN monomérica o heterodimérica indica proteína LAGN que procede de los neutrófilos del individuo. Cabe esperar, pero no a la par de la invención, que la determinación del

60

origen de la proteína LAGN ayudará en el diagnóstico de la afección y permitirá, entre otras cosas, un tratamiento mejorado y dirigido.

Estas y otras ventajas y mejoras se comprenderán de una forma más completa a la vista de la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La descripción detallada se comprenderá de una forma más completa a la vista de los dibujos, en los que:

- 10 La Fig. 1 muestra los niveles pre- y posoperatorios de creatinina en plasma como se describe en el Ejemplo 1. Los niveles superiores normales para hombres y mujeres, respectivamente, son 100 $\mu\text{mol/L}$ y 90 $\mu\text{mol/L}$. Los niveles preoperatorios fueron significativamente elevados en comparación con los niveles normales tanto para hombres como para mujeres ($p < 0,001$).
- 15 Las Figuras 2A y 2B muestran los niveles pre- y posoperatorios de LAGN en orina medidos usando un radioinmunoanálisis (RIA) que emplea un anticuerpo policlonal y un ensayo que usa dos anticuerpos monoclonales, respectivamente, como se describe en el Ejemplo 1. También se muestran los niveles de sujetos sanos. La línea horizontal indica el 97,5 superior, el percentil de los controles sanos. Las diferencias generales entre los niveles pre- y posoperatorios se estimaron mediante ANOVA y se muestran en las figuras. Para ambos ensayos, los niveles posoperatorios fueron significativamente diferentes de los niveles preoperatorios en los tres intervalos de tiempo ($p < 0,001$).
- 20 Las Figuras 3A-3C muestran diagramas de caja de la relación entre los niveles de LAGN en orina 2 horas después de la operación y el tiempo de circulación extracorpórea (tiempo de CEC) medido usando un ensayo RIA que emplea un anticuerpo policlonal, un ensayo ELISA que usa anticuerpo policlonal y monoclonal, y un ensayo que usa dos anticuerpos monoclonales, respectivamente, como se describe en el Ejemplo 1. Se indican las diferencias estadísticas y el aumento en veces de las medianas.
- 25 Las Figuras 4A y 4B muestran la relación entre los niveles de LAGN en orina y la VFG (cistatina C en plasma) medida usando un ensayo RIA que emplea un anticuerpo policlonal y un ensayo que usa dos anticuerpos monoclonales, respectivamente, como se describe en el Ejemplo 1. Se muestran los resultados del análisis de regresión lineal.
- 30 La Fig. 5 muestra la relación entre las mediciones de proteína LAGN usando un RIA que emplea un anticuerpo policlonal contra la LAGN y un ensayo que usa dos anticuerpos monoclonales, en orina, como se describe en el Ejemplo 1. Análisis de regresión lineal: $r^2 = 0,86$, $p < 0,0001$, $n = 331$. El inserto muestra la relación entre los dos ensayos en el extremo inferior de las concentraciones.
- 35 La Fig. 6 muestra los resultados de las Western Blot como se describe en el Ejemplo 2 de diferentes formas moleculares de la LAGN en las muestras de orina U1 y U2 obtenidas de dos pacientes que se han sometido a cirugía cardíaca.
- La Fig. 7 muestra las mediciones de LAGN en las fracciones de la filtración en gel Superdex™ -75 de orina usando diferentes ensayos basados en anticuerpos como se describe en el Ejemplo 2. Las formas moleculares principales de la LAGN en el pico 1 y el pico 2 son el dímero y el monómero, respectivamente. El inserto es la amplificación del pico
- 40 1.
- La Fig. 8 muestra la evolución temporal de la síntesis de LAGN por células HK-2 cultivadas en medio acondicionado, determinada en los momentos indicados, como se describe en el Ejemplo 2. Los valores son medias \pm DE procedentes de los ensayos por duplicado de tres experimentos independientes. Los marcadores * y ** representan $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente.
- 45 Las Figuras 9A y 9B muestran los niveles de LAGN secretada de células HK-2 cultivadas en medio completo o en medio completo suplementado con estímulos (Fig. 9A), o cultivadas en medio de queratinocitos libre de suero (K-SFM) o en K-SFM suplementado con estímulos (Fig. 9B). Los valores son medias \pm DE procedentes de los ensayos por duplicado de tres experimentos independientes. Los marcadores *, ** y *** representan $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente.
- 50 La Fig. 10 muestra en el panel inferior la detección de LAGN secretada de células HK-2 cultivadas con el medio acondicionado mediante Western Blot, y en el panel superior la expresión de ARNm de LAGN de células HK-2 recogidas en los intervalos de tiempo indicados después de la adición de medio fresco (C) o medio suplementado con 1 ng/mL de IL- β (S).
- 55 Los diversos aspectos, características y formas de realización de la invención se comprenderán de una forma más completa a la vista de la descripción detallada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 60 La LAGN se aisló originalmente de los neutrófilos humanos y el trabajo anterior indicaba que la medición de LAGN en

- sangre es un medio excelente para distinguir las infecciones agudas provocadas por bacterias y virus. Más recientemente, se han estudiado las estrechas relaciones entre la excreción de LAGN, por ejemplo, en muestras de fluidos corporales tales como la orina, y la lesión renal aguda. Sorprendentemente, una comparación de las mediciones de LAGN con un ensayo monoclonal-monoclonal y con ensayos que emplean un anticuerpo policlonal mostró
- 5 diferencias importantes en el rendimiento clínico de estos ensayos. Los resultados evidenciaron que la elección de los anticuerpos en los ensayos es crítica y, particularmente, el uso de anticuerpos que tienen capacidad de reaccionar con más de dos epítomos de la proteína LAGN proporciona ensayos de mayor sensibilidad, lo que evidencia que estos ensayos identifican diferentes variantes de la LAGN excretadas en diversas condiciones. Los presentes métodos, dispositivos y kits, por lo tanto, emplean anticuerpos contra la LAGN que tienen la capacidad de reaccionar con más
- 10 de dos epítomos de la proteína LAGN. A este respecto, tal anticuerpo contra la LAGN puede comprender uno o más anticuerpos policlonales contra la LAGN, y/o una combinación de uno o más anticuerpos policlonales contra la LAGN con uno o más anticuerpos monoclonales contra la LAGN, como se describe con más detalle a continuación. Además, el anticuerpo o anticuerpos contra la LAGN pueden emplearse para la captura de proteína LAGN y/o con un marcador detectable.
- 15 Los métodos emplean una muestra de fluido corporal para la detección. En una forma de realización más específica, la muestra comprende orina, sangre, suero o plasma, o un componente purificado de los mismos. En una forma de realización más específica, la muestra es orina.
- 20 En una forma de realización, el método comprende (a) poner en contacto una muestra de fluido corporal del individuo con un dispositivo de ensayo que incluye anticuerpo contra la LAGN y un marcador detectable, para permitir la complejación de la proteína LAGN en la muestra con el anticuerpo contra la LAGN, y (b) determinar una cantidad de complejo formado entre la proteína LAGN de la muestra y el anticuerpo contra la LAGN en el dispositivo de ensayo que usa el marcador detectable, donde el anticuerpo contra la LAGN en el dispositivo tiene capacidad de unión con
- 25 más de dos epítomos de la proteína LAGN, y donde la cantidad del complejo formado representa un nivel de lesión renal aguda. Como se comentó anteriormente, el anticuerpo contra la LAGN que tiene capacidad de unión con más de dos epítomos de la proteína LAGN puede ser proporcionado por uno o más anticuerpos contra la LAGN diferentes.
- Puede realizarse una calibración con un dispositivo o técnica en particular para determinar una cantidad cualitativa o
- 30 cuantitativa del complejo formado que sea representativa de lesión renal aguda. En una forma de realización específica, donde la medición se realiza mediante radioinmunoanálisis (RIA), una cantidad que es representativa de lesión renal aguda es 60 ng/ml o más de proteína LAGN. En otra forma de realización, donde la medición se realiza mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), una cantidad que es representativa de lesión renal aguda es 100 ng/ml o más de proteína LAGN.
- 35 En una forma de realización, los métodos emplean un anticuerpo policlonal contra la LAGN, por ejemplo, como desvelan Xu y col., *Journal of Immunological Methods*, 171:245-252 (1994), incorporado en el presente documento por referencia. Por ejemplo, como describen Xu y col., los anticuerpos policlonales contra la LAGN (LNH) se producen en conejos mediante inyecciones intracutáneas en sitios múltiples en los conejos de un total de 72 µg de proteína
- 40 purificada homogeneizada en adyuvante completo e incompleto de Freund. La especificidad de los anticuerpos puede evaluarse mediante inmunodifusión doble (Devereux y col., *Nucleic Acid Research*, 12 (1): 387-394 (1984)) en agarosa y ensayarse contra extractos de gránulos de neutrófilos y contra las proteínas purificadas siguientes: catepsina G, elastasa, mieloperoxidasa, lisozima, lactoferrina, proteína catiónica del eosinófilo (PCE) y proteína X del eosinófilo (PXE/EDN). Por supuesto, pueden emplearse otros anticuerpos contra la LAGN.
- 45 En una forma de realización, los métodos según la invención comprenden (a) poner en contacto una muestra de fluido corporal del individuo con un anticuerpo policlonal contra la LAGN, y (b) determinar una cantidad de complejo formado entre la LAGN de la muestra y el anticuerpo policlonal contra la LAGN usando un marcador detectable, donde la cantidad del complejo representa un nivel de lesión renal aguda. En una forma de realización específica, por ejemplo,
- 50 el anticuerpo contra la LAGN comprende un anticuerpo policlonal y la cantidad de complejo formado entre la proteína LAGN en la muestra y el anticuerpo contra la LAGN se determina mediante técnicas de radioinmunoanálisis convencionales. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica e incluyen también el uso de técnicas de radioinmunoanálisis doble, donde se pueden emplear dos anticuerpos policlonales o donde se puede emplear un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal. En otra forma de realización, la cantidad de complejo formado entre
- 55 la proteína LAGN en la muestra y el anticuerpo contra la LAGN se determina mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), donde el ELISA emplea al menos un anticuerpo policlonal contra la LAGN. Las técnicas ELISA también son bien conocidas en la técnica. En formas de realización específicas que usan un procedimiento ELISA, el dispositivo de ensayo incluye un anticuerpo policlonal contra la LAGN y un anticuerpo monoclonal contra la LAGN, uno de estos anticuerpos contra la LAGN está unido a un sustrato y el otro de estos anticuerpos contra la LAGN
- 60 está unido al marcador detectable. En una forma de realización más específica, el anticuerpo policlonal contra la LAGN

está unido a, es decir, inmovilizado sobre, el sustrato. En una forma de realización adicional, el anticuerpo policlonal contra la LAGN está unido a un sustrato y un anticuerpo monoclonal contra la LAGN está unido al marcador detectable. Como alternativa, el ELISA puede emplear un dispositivo de ensayo que incluye dos anticuerpos policlonales contra la LAGN diferentes, uno de estos anticuerpos contra la LAGN está unido a un sustrato y el otro de estos anticuerpos

- 5 contra la LAGN está unido al marcador detectable. Se pueden emplear otras técnicas de ensayo conocidas en la técnica donde, por ejemplo, al menos un anticuerpo policlonal contra la LAGN está inmovilizado sobre un sustrato y, en una forma de realización más específica, el marcador detectable está unido a otro anticuerpo contra la LAGN, que puede ser un anticuerpo monoclonal contra la LAGN o un segundo anticuerpo policlonal contra la LAGN.
- 10 Como resultará evidente, la invención puede usarse además para monitorizar el tratamiento de la lesión renal aguda mediante el análisis de múltiples muestras de un individuo antes y después de, o durante, un régimen de tratamiento. Tales métodos generalmente comprenden poner en contacto una primera muestra de fluido corporal del individuo con un primer dispositivo de ensayo como se ha descrito y determinar una cantidad de complejo formado entre la proteína LAGN de la primera muestra y el anticuerpo contra la LAGN en el primer dispositivo de ensayo, poner en contacto una
- 15 segunda muestra de fluido corporal del individuo, obtenida después de comenzar el tratamiento, con un segundo dispositivo de ensayo como se ha descrito y determinar una cantidad de un segundo complejo formado entre la LAGN de la segunda muestra y el anticuerpo contra la LAGN en el segundo dispositivo de ensayo, y comparar la cantidad del primer complejo con la cantidad del segundo complejo. Una reducción en la cantidad del segundo complejo en comparación con la cantidad del primer complejo indica que el tratamiento es efectivo.

- 20 La invención está dirigida a métodos para determinar un origen de la proteína lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (LAGN) en una muestra de un individuo. Tales métodos son particularmente efectivos para distinguir entre proteína LAGN de riñón y proteína LAGN de neutrófilos. En una forma de realización, el método comprende (a) determinar las cantidades relativas de las formas monomérica, dimérica y heterodimérica de la proteína LAGN en la
- 25 muestra, y (b) comparar las cantidades determinadas, donde una cantidad predominante de proteína LAGN monomérica y/o heterodimérica en comparación con la proteína LAGN dimérica indica proteína LAGN que procede del riñón del individuo, mientras que una cantidad igual o predominante de proteína LAGN dimérica en comparación con la proteína LAGN monomérica o heterodimérica indica la proteína LAGN que procede de los neutrófilos del individuo. Se ha descubierto que la proteína LAGN de origen renal está sustancialmente libre de la forma dimérica de
- 30 la proteína LAGN, por ejemplo, como se demuestra mediante Western Blot. En una forma de realización específica, la muestra comprende orina. En otra forma de realización específica, las cantidades respectivas de proteína LAGN en la muestra se determinan poniendo en contacto la muestra con un dispositivo de ensayo que incluye un anticuerpo monoclonal contra la LAGN. En otra forma de realización, las cantidades respectivas de proteína LAGN en la muestra se determinan poniendo en contacto la muestra con un dispositivo de ensayo que incluye un anticuerpo policlonal
- 35 contra LAGN. Se puede emplear cualquiera de los dispositivos y técnicas de ensayo como se ha descrito anteriormente, Western Blot, u otras técnicas y/o dispositivos convencionales.

- Como se demuestra en el Ejemplo 2 más adelante, los anticuerpos policlonales y monoclonales identifican (es decir, se complejan con) las formas monomérica, dimérica y heterodimérica de la proteína LAGN. Sin embargo, en la LAGN
- 40 que procede del riñón, los resultados están sustancialmente libres de la forma dimérica de la proteína LAGN, mientras que la forma dimérica de la LAGN es predominante en los resultados de la proteína LAGN procedente de neutrófilos. Sin desear ceñirnos a la teoría, se cree que las diferentes LAGN exponen diferentes epítopos que, a continuación, son captados de manera diferente, por ejemplo, por los anticuerpos monoclonales. Por tanto, la comparación como se ha descrito puede diferenciar la proteína LAGN de origen renal de la proteína LAGN de origen neutrófilo.

- 45 En los siguientes Ejemplos se ilustran diversos aspectos de la invención.

EJEMPLO 1

- 50 Este ejemplo describe un estudio de determinaciones de LAGN que usan un anticuerpo contra la LAGN que tiene capacidad de unión con más de dos epítopos de la proteína LAGN y las comparaciones con las determinaciones de LAGN que usan solo dos anticuerpos monoclonales.

Pacientes y muestras

- 55 Un total de 59 pacientes adultos que se sometieron a cirugía cardíaca en el Hospital Universitario de Uppsala fueron incluidos en el estudio. La edad de los pacientes osciló de 27-85 años, con una media de 63, y los pacientes comprendieron 42 hombres y 17 mujeres. Las cirugías cardíacas comprendieron 23 injertos de derivación de la arteria coronaria, 15 sustituciones de la válvula aórtica, 4 reparaciones mitrales, 3 procedimientos combinados, 8 implantes
- 60 de dispositivos de asistencia ventricular izquierda y otros 6 procedimientos.

Las muestras de orina y sangre se recogieron antes de la operación y en diversos intervalos de tiempo (2, 24, 48 y 72 horas) después de la cirugía cardíaca. Las muestras de orina se centrifugaron inmediatamente a 3.000 rpm a 4 ° C durante 15 min. El plasma con EDTA se obtuvo mediante centrifugación de la sangre a 3.000 rpm a 4 ° C durante 15 min. Todos los sobrenadantes de las muestras se almacenaron inmediatamente en alícuotas a -20 °C. Asimismo, se recogieron otras 101 muestras de orina de empleados y estudiantes sanos y sirvieron como controles normales.

Ensayos de los niveles de LAGN en orina

10 Los niveles de LAGN se midieron mediante tres ensayos diferentes. Una primera técnica de ensayo empleó un RIA basado en policlonales, en general, según las enseñanzas de Xu y col., arriba. Una segunda técnica de ensayo empleó un ELISA basado en policlonal-monoclonal. La tercera técnica de ensayo empleó un ensayo basado en monoclonal-monoclonal. Por tanto, las dos primeras técnicas son según la invención, mientras que la tercera técnica se empleó con fines comparativos.

15 Más específicamente, el radioinmunoanálisis (RIA) basado en anticuerpo policlonal se realizó como habían descrito anteriormente Xu y col. con algunas modificaciones. Se mezcló secuencialmente una solución de 50 µl de muestra o de patrón (2 µg/L a 128 µg/L) con 50 µL de LAGN marcada con I¹²⁵ y 50 µL de anticuerpos específicos, diluidos adecuadamente en el tampón de ensayo RIA. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas.

20 Posteriormente, se añadieron 500 µl de suspensión de celulosa recubierta con un segundo anticuerpo en fase sólida (AA-SAC1, IDS LTD, Inglaterra) y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Los complejos de anticuerpo contra la LAGN unidos sobre celulosa recubierta con anticuerpo de IgG anti-conejo se separaron y precipitaron por medio de centrifugación a 3400 rpm durante 15 minutos. Después de la decantación, se midió la radioactividad. Los coeficientes de variación (CV) intra- e interensayo fueron inferiores al 6 % y 10 %, respectivamente. Los resultados de las

25 concentraciones de LAGN en orina medidas mediante el dispositivo de ensayo RIA se designan como LAGN RIA.

El dispositivo ELISA basado en anticuerpo policlonal y monoclonal se desarrolló en este estudio. En resumen, las placas de microtitulación (Nunc Maxsorp, Agogent, Dinamarca) se recubrieron durante la noche con anticuerpo monoclonal anti-LAGN (100 µl/pocillo, 1 µg/mL diluido en tampón de carbonato-bicarbonato (Na₂CO₃-NaHCO₃ 0,05 M, pH 9,6, Invitrogen Corporation, Reino Unido) a 4 ° C. Los sitios de unión adicionales se bloquearon con tampón de carbonato-bicarbonato que contenía un 2 % de albúmina sérica bovina (200 µL/pocillo, Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemania) a 37 ° C durante 1 hora. Se añadieron 100 µL de los patrones (de 0,1 ng/ml a 6,4 ng/ml) o de muestras diluidas en solución de ensayo (PBS que contenía un 0,2 % de albúmina sérica bovina, 0,1 % de Tween-20, 0,05 % de CTAB y 0,02 % de NaN₃) por duplicado y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas.

35 Posteriormente, se añadieron 100 µL de anticuerpo policlonal anti-LAGN de conejo diluido por pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, seguidos de 100 µL de anticuerpos conjugados a peroxidasa de rábano picante diluidos (GE Healthcare, Reino Unido) y se incubaron a temperatura ambiente durante otra hora. La reacción enzimática de las placas se visualizó con una solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (100 µL/pocillo, Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemania) a temperatura ambiente durante 20 minutos, y se detuvo mediante la adición de 100 µL/pocillo

40 de H₂SO₄ 1 M. Las placas se lavaron cuatro veces en un tampón de lavado (PBS que contenía un 0,05 % de Tween-20) entre todas las etapas usando un lavador de microplacas (Anthos fluido, Salzburgo, Austria). La absorbancia se midió a 450 nm, con una lectura de referencia a 540 nm en pocillos en blanco, mediante un lector de microplacas (SPECTRAMax 250, GMI, Inc., EE. UU.). El CV intraensayo promedio fue del 2,8 % (intervalo del 0,5 % al 4,7 %) y el CV interensayo fue 6,3 (intervalo del 2,1 al 10,4 %). La recuperación promedio fue del 99 % (intervalo del 93 al 105

45 %). Los resultados de las concentraciones de LAGN en orina medidas mediante ELISA se designan como LAGN ELISA.

El ensayo de LAGN basado en el ensayo con doble anticuerpo monoclonal se realizó según las instrucciones del fabricante. Los coeficientes de variación intra- e interensayo (CV %) fueron inferiores al 6 %. Los resultados de las

50 concentraciones de LAGN en orina medidas mediante este dispositivo se denominan LAGN Mono-mono.

Los niveles de creatinina en orina se midieron en el instrumento Architect en el Departamento de Química Clínica del Hospital Universitario de Uppsala habitual y sirvieron para corregir los niveles de LAGN en orina en función de las variaciones en las diluciones de orina. Por tanto, los niveles de LAGN en orina se presentan como LAGN en µg/mmol

55 de creatinina. Todas las mediciones se realizaron por duplicado y los investigadores del laboratorio no conocieron las fuentes de las muestras y los resultados clínicos hasta el final del estudio.

Western Blot de LAGN en orina

60 Se realizaron Western Blot como se habían descrito anteriormente Towbin y col., Proc. Natl Acad Sci. USA, 76:4350-

4 (1979). En resumen, se aplicaron 20 μ L de muestra de orina a gel Nu-PAGE® Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen Corporation, EE. UU.). Después de la SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF usando un tampón de transferencia Nu-PAGE® (Invitrogen Corporation, EE. UU.) a 25 V durante 1 hora. Los sitios de unión adicionales de la membrana de PVDF se bloquearon mediante una solución de bloqueo (GE Healthcare, Reino Unido) durante 1 hora. Las transferencias se incubaron con los anticuerpos monoclonales de ratón anti-LAGN durante 1 hora, seguida de 45 min de incubación con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (GE Healthcare, Reino Unido). Las inmunotransferencias se detectaron usando quimioluminiscencia mejorada según las instrucciones del fabricante (sistema de Western Blot Amersham ECL™, GE Healthcare, Reino Unido).

10 **Ensayos adicionales**

Los niveles de creatinina y cistatina C en plasma se midieron usando procedimientos rutinarios en el Departamento de Química Clínica, Hospital Universitario de Uppsala.

15 **Análisis estadístico**

Las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y Wilcoxon para comparaciones no relacionadas y relacionadas, el análisis de regresión lineal y el análisis de varianza de una vía (ANOVA) se realizaron mediante Medcalc 9.5 (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica) y STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, EE. UU.). La significancia estadística se estableció en $p < 0,05$.

Resultados

Los niveles de creatinina en plasma antes y hasta 78 horas después de la operación se presentan en la Fig. 1 y no muestran diferencias entre los períodos de tiempo. El resultado clínico indicó que tres sujetos tenían signos de lesión renal aguda con elevaciones de creatinina en plasma posoperatorias de $> 50\%$.

Niveles de LAGN en orina

Los niveles de LAGN en orina obtenidos de sujetos sanos y pacientes que se habían sometido a cirugía cardíaca se midieron usando las tres técnicas descritas. Los resultados determinados usando las técnicas RIA y Mono-mono, respectivamente, se muestran en las Figs. 2A y 2B. Los niveles preoperatorios fueron similares a los controles normales. Dos horas después de la operación, los niveles aumentaron significativamente ($p < 0,0001$), con aproximadamente la mitad de los pacientes con niveles por encima del límite superior de los normales. Los aumentos en veces de las medianas fueron de 18,7 cuando se midieron con el RIA y aumentos en veces de 15,6 y 11,4 cuando se midieron con los ensayos ELISA y Mono-mono, respectivamente. Después de 24 horas, los niveles se redujeron nuevamente, pero seguían siendo superiores a los niveles preoperatorios. Los niveles se mantuvieron significativamente más altos durante todo el período posoperatorio ($p < 0,0001$). A las 72 horas, los aumentos en veces fueron 6,8, 8,5 y 5,9 para los ensayos RIA, ELISA y Mono-mono, respectivamente. Se observaron patrones similares a lo largo del tiempo con los tres ensayos.

Relación con el tiempo de circulación extracorpórea (CEC)

Se encontraron correlaciones positivas significativas entre el tiempo de CEC y los niveles de LAGN obtenidos 2 horas después de la operación cuando se midieron en orina mediante la técnica RIA ($r^2 = 0,30$, $p < 0,0001$) y la técnica ELISA ($r^2 = 0,16$, $p = 0,006$). Sin embargo, estas correlaciones no se encontraron con la técnica Mono-mono. Cuando se subagrupó mediante tiempo de CEC superior o inferior a 90 min, los resultados del RIA aumentaron 12,6 veces en las muestras posoperatorias a las 2 horas ($p = 0,006$). Los resultados del ELISA aumentaron 6,5 veces ($p = 0,027$) y los resultados del Mono-mono 5,2 veces ($p = 0,07$), como se muestra en las Figs. 3A-3C.

Relación entre niveles de LAGN en orina y función renal.

Se midieron los niveles de creatinina y cistatina C en plasma como indicadores de la función renal. Como se ha mostrado anteriormente, los niveles de creatinina permanecieron inalterados en la mayoría de los sujetos, con solo tres sujetos con signos posoperatorios de lesión renal aguda como se define por un aumento de $> 50\%$. Los niveles de cistatina C se usaron para calcular la velocidad de filtración glomerular (VFG). En un análisis univariante, se relacionó la VFG con la LAGN (RIA) ($r^2 = 0,28$, $p < 0,001$) y la LAGN (Mono-mono) ($r^2 = 0,25$, $p < 0,001$) como se muestra en las Fig. 4A y 4B. También se analizó la relación entre LAGN en orina y creatinina en plasma. Los sujetos se clasificaron en dos grupos según el aumento porcentual de creatinina en plasma durante el período postoperatorio de 72 horas en comparación con el valor inicial ($< 120\%$ o $> 119\%$). Los niveles posoperatorios a las 2 horas de

LAGN (RIA) fueron significativamente superiores en el grupo en el que los niveles de creatinina aumentaban > 119 % ($p = 0,03$) en contraste con los niveles de LAGN (Mono-mono), que no fueron significativamente elevados (resultados no mostrados).

5 **Correlaciones entre los tres ensayos de LAGN**

La correlación general entre LAGN (RIA) y LAGN (Mono-mono) se muestra en la Fig. 5 ($r^2 = 0,86$, $p < 0,0001$, $n = 331$). Las correlaciones en diferentes intervalos de tiempo se presentan en la Tabla 1 y muestran muy buenas correlaciones con r^2 , que oscilan entre 0,952-0,996, pero con la excepción de los resultados obtenidos 2 horas después de la
 10 operación. En este intervalo de tiempo, el r^2 fue de 0,680 y significativamente inferior al resto ($p < 0,0001$). La relación entre LAGN (RIA) y LAGN (Mono-mono) en la cohorte de sujetos aparentemente sanos fue de $r^2 = 0,887$ y también significativamente diferente de los resultados a las 2 horas ($p = 0,001$). Un análisis de regresión de Passing y Bablok de los 331 resultados mostró la ecuación de LNH (RIA) = $0,6553 + 0,5358 \times \text{LAGN (Mono-mono)}$ con una desviación significativa de la linealidad ($p < 0,01$), que también fue el caso para la comparación del ensayo de LAGN (Mono-
 15 mono) y el ensayo de LAGN (ELISA), $\text{LAGN (ELISA)} = 0,0370 + 0,1135 \times \text{LAGN (Mono-mono)}$. Sin embargo, la comparación de los ensayos de LAGN (RIA) y LAGN (ELISA) proporcionó la ecuación $\text{LAGN (ELISA)} = -0,002192 + 0,2002 \text{LAGN (RIA)}$, sin desviación de la linealidad.

Formas moleculares de la LAGN en la orina

20 Las principales formas de LAGN encontradas en la orina antes y después de la cirugía cardíaca tenían pesos moleculares aparentes de 25 (monómero), 45 (homodímero) y 90-130 kDa (complejos con MMP-9), respectivamente. La presencia de estas formas diferentes variaba antes y después de la cirugía. Se examinaron las relaciones entre los homodímeros y los monómeros en base a ciclos de Western Blot. Se muestra que la presencia relativa de
 25 homodímeros aumentó hasta 24 horas después de la operación ($p = 0,02$), después de lo cual la relación tiene una tendencia a disminuir.

Análisis de resultados

30 Los resultados presentados en el presente documento muestran que la elección de los anticuerpos en el ensayo de LAGN es crítica para identificar la multitud de variantes diferentes de LAGN excretadas en la orina en diversas condiciones. Particularmente, los ensayos que emplean un anticuerpo contra la LAGN que tiene capacidad para reaccionar con más de dos epítomos de la proteína LAGN proporcionan una sensibilidad mejorada.

35 Este estudio implicó a pacientes adultos que se habían sometido a cirugía cardíaca. La lesión renal aguda es una de las complicaciones posoperatorias más graves que pueden afectar a estos pacientes. En este estudio, los niveles promedio de creatinina en plasma permanecieron inalterados, con solo tres sujetos con elevaciones de > 50 % como signos de lesión renal aguda. A pesar de esto, se encontraron incrementos de 10-100 veces en los niveles de LAGN en orina en aproximadamente la mitad de los pacientes, tan solo 2 horas después de la finalización de la operación.
 40 Además, los niveles de LAGN permanecieron elevados durante todo el período de observación. En general, los niveles de LAGN en orina mostraron una relación débil, pero significativa, con la función renal como se mide mediante los niveles de cistatina C o creatinina en plasma, lo que respalda la idea de que la LAGN es un marcador más temprano y más sensible de disfunción renal. De hecho, dos de los tres pacientes con elevaciones de creatinina > 50 % presentaban niveles de LAGN muy elevados 2 horas después de la operación. Resulta evidente a partir de este estudio
 45 que el mayor aumento en la LAGN se producía poco después de la operación en la mitad de los pacientes, pero que este aumento era solo temporal y, a continuación, se producía un aumento gradual en los días siguientes que afectaba a todos los pacientes. Por tanto, pero sin desear ceñirnos a la teoría, estos patrones pueden reflejar los diferentes mecanismos implicados en la excreción urinaria de LAGN en la orina. La fase temprana puede reflejar la excreción de LAGN preformada procedente de diferentes fuentes, tales como el epitelio renal y la acumulación de neutrófilos,
 50 mientras que la excreción retardada puede reflejar la síntesis de novo en el riñón. Los hallazgos de variaciones en la magnitud en que se presentan los diferentes tamaños moleculares de la LAGN en la orina en diferentes momentos también sugieren que están implicados mecanismos diferentes.

La comparación de los tres ensayos diferentes mostró diferencias significativas. En general, los ensayos estaban
 55 altamente correlacionados, pero con algunas excepciones obvias. Estas excepciones resultaron concentrarse en las muestras obtenidas 2 horas después de la operación, como una sugerencia del hecho de que, en estas circunstancias, los tres ensayos miden parcialmente variantes moleculares diferentes de la LAGN. Estas diferencias se ejemplificaron aún más por el hecho de que los resultados del ensayo RIA y ELISA que emplean anticuerpos policlonales mostraron relaciones más estrechas con las variables clínicas, tales como la magnitud del tiempo de circulación extracorpórea y
 60 la función renal, que el ensayo Mono-mono. Por lo tanto, estos resultados muestran que la identificación de todas las

formas de la LAGN en la orina es importante para el rendimiento clínico del ensayo. El RIA es un ensayo basado en policlonales, que probablemente aborda todos los epítomos disponibles en la molécula, mientras que el ensayo a basado en monoclonal-monoclonal aborda solo los epítomos seleccionados, algunos de los cuales pueden o no estar camuflados por formaciones de complejos y otras alteraciones moleculares. El ensayo ELISA basado en policlonal-monoclonal presentó características un tanto intermedias entre estos dos extremos, lo que puede explicarse por el hecho de que esta configuración permite el reconocimiento de más epítomos que un ensayo de doble monoclonal, pero algo menos que un ensayo basado únicamente en policlonales. En resumen, los resultados descritos confirman que la LAGN es un biomarcador temprano útil de lesión renal posoperatoria cuando se mide en la orina y, nuevamente, demuestran que la configuración de los anticuerpos del ensayo tiene un impacto sobre el rendimiento clínico del ensayo, ya que algunas formas de la LAGN no pueden identificarse mediante ensayos con especificidades de anticuerpos restringidas.

EJEMPLO 2

15 Este ejemplo describe un estudio de las determinaciones de LAGN con respecto a las formas monomérica, dimérica y heterodimérica en la determinación del origen de la proteína LAGN.

Muestras de orina y separación mediante filtración en gel

20 En total, se recogieron 33 muestras de orina preoperatorias y en los intervalos de tiempo de 2 h y 24 h después de la cirugía cardíaca. Las muestras de orina se centrifugaron inmediatamente a 3.000 rpm durante 15 min a 4 ° C y se almacenaron en alícuotas a -20 ° C. La filtración en gel de una muestra de orina a las 2 h después de la operación se realizó en una columna preempaquetada Superdex™ 75 HR 10/30 usando el sistema FPLC (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia). Se recogieron fracciones de 250 L y se almacenaron a -20 ° C. El tampón de elución fue PBS. La LAGN en las fracciones se determinó utilizando los RIA y ELISA descritos a continuación.

ELISA sensibles para cuantificación de LAGN

Se emplearon seis ELISA basados en diferentes anticuerpos para la cuantificación de la LAGN, concretamente 1) 30 Mab697-policlonal (el ELISA monoclonal-policlonal como se describe en el Ejemplo 1), 2) Mab764-Mab765, 3) Mab764-policlonal, 4) policlonal-Mab765, 5) policlonal-policlonal, y Mab-697-Mab765. Los protocolos básicos para estos cinco ELISA son los mismos que los descritos en el Ejemplo 1, a excepción de los anticuerpos específicos usados en el ensayo. En resumen, las placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc Maxsorp, Agogent, Dinamarca) se recubrieron con anticuerpos policlonales de conejo o monoclonales de ratón (Mab697 y Mab764) contra la LAGN humana %. (Diagnostics Development, Uppsala, Suecia). Las muestras y los patrones (que oscilaban de 0,039-5 µg/L) 35 (100 µL/pocillo) se incubaron durante 60 min (muestras de orina y fracciones de filtración en gel) o 90 min (sobrenadantes de cultivo celular) a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se añadieron 100 µL/pocillo de anticuerpos policlonales de conejo biotinizados diluidos o anticuerpo monoclonal de ratón (Mab765) contra la LAGN humana y se incubaron a TA durante 60 min, seguidos de la adición de 100 µL pocillo de peroxidasa de rábano 40 conjugada a estreptavidina diluida (GE Healthcare , Reino Unido) (30 min a TA). Las placas se lavaron cuatro veces en un tampón de lavado (PBS que contenía un 0,05 % de Tween-20) usando un lavador de microplacas (Anthos fluido, Salzburgo, Austria) entre todas las etapas. La reacción enzimática se visualizó mediante una solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (100 µL/pocillo) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) como sustrato a TA durante 15 min y la reacción se detuvo añadiendo H₂SO₄ 1 M (100 µL/pocillo). Se leyó la absorbancia a 450 nm con un espectrofotómetro 45 (SPECTRAMax 250, GMI, Inc., EE. UU.).

RIA basado en anticuerpo policlonal para la cuantificación de LAGN

El RIA se realizó como se ha descrito anteriormente. En resumen, se mezclaron 50 µL de cada muestra o patrón (2 50 µg/L-128 µg/L) con 50 µL de LAGN marcada con ¹²⁵I y 50 µL de anticuerpos específicos. La mezcla se incubó durante 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 500 µL de suspensión de celulosa recubierta con un segundo anticuerpo en fase sólida (AA-SAC1, IDSLTD, Reino Unido) y se incubaron durante 1 h a 4 ° C. Los complejos de LAGN-anticuerpo unidos sobre la celulosa recubierta con anticuerpo de IgG anti-conejo se precipitaron mediante centrifugación. Después de la decantación, se midió la radioactividad.

Cultivo de HK-2 y expresión de proteína LAGN

Se adquirió la línea HK-2 (de riñón humano 2, CRL-2190) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés). Esta es una línea de células epiteliales de los túbulos renales proximales humanas procedentes de 60 riñón normal. Las células se immortalizaron mediante transducción con los genes E6/E7 del virus del papiloma humano

16 (HPV-16). Las células se cultivaron en medio de crecimiento completo (medio de queratinocitos libre de suero (K-SFM) suplementado con 0,05 mg/ml de extracto de hipófisis bovina (EHB) y 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (FCE) humano recombinante (Invitrogen-Gibco®, Reino Unido)) o en medio de crecimiento incompleto a 37 ° C en una atmósfera húmeda con un 5 % de CO₂. Asimismo, las células se cultivaron con estímulos específicos que incluían citoquinas (IL-1β o TNF-α) (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemania) y LPS (Invitrogen-Gibco®, Reino Unido). Se sembraron 0,5 × 10⁵ células y 1 ml de medio de crecimiento completo por pocillo en placas de 24 pocillos (FALCON®, EE. UU.). Después del subcultivo durante 48 h, se retiró el medio de crecimiento completo y la monocapa (confluencia de aproximadamente el 90 %) se lavó dos veces con PBS (Invitrogen-Gibco®, Reino Unido). Las células se cultivaron con medios acondicionados durante un período de 72 h. Los sobrenadantes de los medios se recogieron para la cuantificación de LAGN a las 2 h, 12 h, 24 h, 48 h y 72 h, respectivamente.

Evaluación de la expresión génica de LAGN mediante RT-PCR

Las células HK-2 cultivadas normales e inducidas mediante 1 ng/mL de IL-1β se recogieron a las 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h y 24 h para el aislamiento del ARN total. El ARN se extrajo utilizando el RNeasy® Mini Kit (QIAGEN, Reino Unido) según el protocolo del fabricante. El ADNc de la primera cadena se sintetizó usando la transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen, Reino Unido) con 200 ng de ARN total. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo usando ADN polimerasa de Taq (Invitrogen, Reino Unido) en el termociclador para PCR DNA Engine (PTC-200) (Bio-Rad, EE. UU.). Las secuencias de los cebadores de oligonucleótidos específicos para LAGN (5'-TCACCTCCGTCCTGTTAGC-3' y 5'-CGAAGTCAGCTCCTTGGTTC-3') y β-actina (5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGG-3' y 5'-GTGTTGAAGGTCTCAAACATGAT-3') se seleccionaron según la bibliografía y fueron sintetizadas por Thermo SCIENTIFIC (Alemania). Las condiciones iniciales de desnaturalización son 94 ° C durante 2 min. La amplificación por PCR se realizó usando una etapa de desnaturalización de 30 segundos a 94 ° C, seguida de una etapa de anillamiento de 30 segundos a 60 ° C (para LAGN) o 59 ° C (para β-actina), y una extensión de 30 segundos a 72 ° C. Se llevaron a cabo un total de 30 ciclos para ambos genes, seguidos de una extensión final durante 10 min a 72 ° C. Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % y se detectaron mediante tinción con bromuro de etidio. El tamaño esperado de la PCR produce (242 pb y 119 pb para LAGN y β-actina, respectivamente) se verificó por referencia a una escalera de ADN de 50 pb (marcador de ADN DirectLoad™) (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemania).

Western Blot

Los productos de la liberación de gránulos de neutrófilos se obtuvieron como se describe. Se recogieron los sobrenadantes de medios de HK-2 acondicionados en el intervalo temporal de 72 h, y se suplementaron con PMSF 0,1 mM (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemania) y comprimidos de cóctel de inhibidores de proteasas Complete™ (Roche, Mannheim, Alemania). Los sobrenadantes se concentraron usando dispositivos de filtro para centrifuga Amicon® Ultra-4 (PM 10 000) (Millipore, EE. UU.). Las SDS-PAGE y las Western Blot se realizaron según las instrucciones del fabricante. En resumen, se aplicaron 25 µL de orina o sobrenadantes acondicionados concentrados o productos de la liberación de neutrófilos a gel Nu-PAGE® Bis-tris al 4-12 % (Invitrogen, EE. UU.) en condiciones no reductoras. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF Hybone-P (GE Healthcare, Reino Unido) usando tampón de transferencia Nu-PAGE® (Invitrogen, EE. UU.) a 25 V durante 1 hora. Los sitios de unión adicionales de la membrana de PVDF se bloquearon mediante una solución de bloqueo (GE Healthcare, Reino Unido) durante 1 h. Las transferencias se incubaron durante la noche a TA con anticuerpos policlonales de conejo o anticuerpos monoclonales de ratón (Mab 697, Mab 699, Mab 763, Mab 764 o Mab 765) o con una mezcla de anticuerpos monoclonales contra la LAGN humana, seguida de una incubación de 1 h con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (GE Healthcare, Reino Unido). Las inmunotransferencias se detectaron usando quimioluminiscencia mejorada según las instrucciones del fabricante (sistema de Western Blot Amersham ECL™, GE Healthcare, Reino Unido).

Análisis estadístico

La prueba t de Student y el análisis de varianza de una vía (ANOVA) se realizaron mediante STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, EE. UU.) y Medcalc 9.5 (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica). Los valores se presentan como medias ± DE y medianas con amplitudes intercuartil. Los p < 0,05 se consideraron significativos.

Resultados

Detección de formas moleculares de LAGN en orina mediante Western Blot

Se usó un anticuerpo policlonal de conejo y cinco anticuerpos monoclonales de ratón contra la LAGN para identificar las formas moleculares de la LAGN en orinas obtenidas de pacientes de cirugía cardíaca. Los experimentos en Biacore

mostraron que los cinco anticuerpos monoclonales reaccionaban a diferentes epítomos. Como se muestra en la Fig. 6 con dos muestras de orina representativas (U1 y U2), se encontraron diferencias notables entre los comportamientos de los anticuerpos. Se identificaron regularmente tres bandas principales mediante los anticuerpos policlonales y se identificaron como las formas monomérica y dimérica de la LAGN y las formas heterodiméricas complejadas de la LAGN. Estas tres formas también fueron detectadas por Mab764 y 765. Sin embargo, también se observaron bandas adicionales con cualquiera de los anticuerpos. El anticuerpo policlonal, sin embargo, parecía tener una afinidad más fuerte por el dímero y una afinidad más débil por el heterodímero que los dos monoclonales. Los Mab764 y 765 tuvieron comportamientos muy similares en la detección de las tres formas moleculares. Las afinidades de Mab764 y Mab765 por la LAGN, de alta a baja, fueron por las formas monomérica, heterodimérica y dimérica, respectivamente. También se muestra que los Mab763, 699 y 697 tienen afinidades fuertes por las formas heterodiméricas, mientras que las afinidades por las formas dimérica y monomérica eran débiles. Sin embargo, la capacidad de los anticuerpos policlonales y los Mab765 y 697 para la detección de formas monoméricas y diméricas en sobrenadantes de granulocitos de neutrófilos estimulados parecía muy similar.

15 Rendimientos del RIA y los cinco ELISA para la medición de LAGN en orina

Las características de rendimiento del RIA y los cinco ELISA se muestran en la Tabla 1:

20 Tabla 1. Mediciones de LNH/LAGN en muestras de orina recogidas de pacientes que se habían sometido a cirugía cardíaca mediante diferentes ensayos

Ensayo	Preop. µg/L	2 h posop. µg / L	24 h posop.	Aumento en veces (Preop./2 h posop.)	Prueba t de Student valor p	ANOVA valor p
RIA	7,19 (2,9-20,3)	248,20 (109-316,1)	26,96 (16,3-50,71)	34,5	0,000011	0,0000020
ELISA 1 (Mab697-Policlonal)	0,94 (0,15-3,13)	28,82 (23,32-37,96)	4,75 (2,59-9,89)	30,7	0,00035	0,00027
ELISA 2 (Mab764-Mab765)	6,22 (1,16-12,8)	192,80 (78,2-287)	15,50 (9,55-40,7)	31,0	0,000055	0,00002
ELISA 3 (Mab764-Policlonal)	3,08 (1,08-10,81)	239,10 (61,6-296,40)	19,80 (6,25-55,35)	77,6	0,000053	0,00015
ELISA 4 (Policlonal-Mab765)	2,26 (0,79-7,84)	164,10 (45,9-207,1)	13,05 (5,89-40,2)	72,6	0,00010	0,000094
ELISA 5 (Policlonal-Policlonal)	2,96 (1,13-12,68)	220,00 (58,4-249,9)	19,00 (7,5-58,15)	74,3	0,000024	0,000079
ELISA 6 (Mab697-Mab765)	1,27 (0,32-3,46)	30,00 (6,4-30)	3,46 (2,07-10,35)	23,6	0,00099	0,00012

Los valores se presentan como medianas y amplitud intercuartilo. La prueba t de Student se realizó entre los grupos preoperatorio y 2 h posoperatorio, y el ANOVA se realizó entre los grupos preoperatorio y 2 h y 24 h posoperatorio.

Se midieron los niveles de LAGN en orina obtenidos antes de la operación y a las 2 h y 24 h después de la operación y los niveles de medios de LAGN obtenidos mediante los ensayos se muestran en la Tabla 1. Los niveles medios de LAGN antes de la operación y 2 h después de la operación medidos mediante RIA fueron los más altos de entre los siete ensayos. Por otro lado, los niveles obtenidos mediante ELISA basados en Mab697 (ELISA 1 y ELISA 6) fueron significativamente más bajos que los otros ensayos. La Tabla 1 muestra las diferencias en los niveles preoperatorios y 2 h después de la operación, así como las diferencias generales durante el periodo de 24 horas. Se observaron diferencias muy significativas pre- y posoperatoriamente con todos los ensayos. Los aumentos en veces de los niveles medios preop. frente a los niveles 2 h posop. fueron superiores y > 70 cuando se midieron mediante ELISA 3 (Mab764-Policlonal), ELISA 5 (policlonal-policlonal) o ELISA 4 (policlonal-Mab765), y de 23-34 veces cuando se midieron mediante RIA, ELISA 2 (Mab764-Mab765), ELISA 1 (Mab 697-policlonal) o ELISA 6 (Mab697-Mab765).

Mediciones de LAGN mediante diferentes ensayos después de la filtración en gel de orina

En base a los resultados de las Western Blot, se realizaron los siguientes dos grupos de experimentos para investigar el rendimiento de los ensayos en la detección de diferentes formas de la LAGN. La filtración en gel de una muestra de orina 2 h después de la operación se realizó en una columna Superdex™ 75 HR. Los niveles de LAGN en las fracciones se midieron mediante RIA y los cinco ELISA y se muestran en la Fig. 7. Se obtuvieron dos picos correspondientes a los volúmenes de elución de las formas monomérica y dimérica, respectivamente, mediante los cinco ELISA, pero solo un pico con el RIA. Este último probablemente se debió a una sensibilidad insuficiente del RIA. Los niveles más altos de LAGN en el pico 2 se obtuvieron con el RIA y los niveles más bajos con el ELISA 1 (ELIOSA basado en Mab697-Policlonal). Todos los ensayos ELISA, excepto el ELISA 1, midieron niveles similares en el pico 1, es decir, LAGN dimérica (inserto de la Fig. 2). El ELISA 1 midió niveles superiores de la LAGN dimérica.

La LAGN está sobrerregulada en las células HK-2 cuando se hacen crecer en condiciones rigurosas

Se cultivaron células HK-2 en diferentes períodos de tiempo con medio de queratinocitos libre de suero (K-SFM), K-SFM suplementado con 0,05 mg/mL de extracto de hipófisis bovina (EHB) o con 5 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (FCE) humano recombinante, o medio de crecimiento completo recomendado por la ATCC (K-SFM suplementado con 0,05 mg/mL de EHB y 5 ng/mL de FCE), seguido de cultivo durante 48 h en condiciones estándar. Los niveles de LAGN en los sobrenadantes de cultivo se determinaron en diferentes intervalos de tiempo (2 h, 12 h, 24 h, 48 h y 72 h) a lo largo de un período de 72 h mediante el ELISA 4. Después de 12 h a 72 h en cultivo, los niveles de LAGN en los sobrenadantes de cultivo K-SFM fueron superiores a los de los otros tres medios de cultivo (Fig. 8). Los niveles más bajos se encontraron en células que habían crecido en medio de crecimiento completo. Los resultados también sugieren niveles superiores de LAGN en los sobrenadantes de las células que han crecido en K-SFM suplementado con EHB, en comparación con las células que han crecido en K-SFM suplementado con FCEr. En general, estos resultados muestran una sobrerregulación de la producción de LAGN en condiciones rigurosas en las que las células se vieron privadas de los factores de crecimiento necesarios.

La LAGN está sobrerregulada en las células HK-2 por la IL- β , el LPS y el TNF- α

Las células HK-2 se hicieron crecer con medio de crecimiento completo durante 48 h, después de lo cual, las células se hicieron crecer más durante diversos períodos de tiempo en presencia de medio de crecimiento completo suplementado con IL- β (1 ng/mL, humano), LPS (125 ng/mL, Klebsiella pneumonia) o TNF- α (20 ng/mL, humano). Como se muestra en la Fig. 9A, la IL- β indujo elevaciones muy significativas de los niveles de LAGN en el sobrenadante (aumento de 8,9 a 41,9 veces). Asimismo, la incubación con TNF- α y LPS indujo algunas elevaciones de LAGN en los sobrenadantes (2,2 y 1,6 veces, respectivamente), pero significativamente inferiores a la IL- β ($p < 0,001$). Las células HK-2 también se cultivaron con K-SFM suplementado con IL- β , TNF- α o LPS. Se observaron elevaciones significativas de la LAGN con la IL- β (aumento de 1,3 a 12,8 veces), pero no con el TNF- α o el LPS (Fig. 9B). Sin embargo, en comparación con las células que habían crecido en medio de crecimiento completo, estas elevaciones fueron significativamente inferiores ($p < 0,001$).

Formas moleculares de la LAGN producidas por las células HK-2

Las formas moleculares de la LAGN secretadas por las células HK-2 se determinaron mediante Western Blot usando anticuerpos monoclonales mezclados (Mab697, Mab764 y Mab765) como anticuerpos de detección. Los resultados mostrados en la Fig. 10 (panel inferior) indican que la forma principal de LAGN secretada por las células HK-2 que habían crecido en medios de cultivo completos o en condiciones rigurosas en K-SFM o en medios suplementados con citoquinas (IL- β o TNF- α) o LPS es la forma monomérica. La forma heterodimérica de la LAGN también resultó evidente después de la estimulación con IL- β , mientras que la forma dimérica estuvo ausente, en contraste con los hallazgos en sobrenadantes de neutrófilos humanos (Fig. 6). En la Fig. 10, se muestran los niveles de ARNm de LAGN en las células HK-2 después de la incubación con IL- β . Los resultados muestran una expresión mayor, lo que indica la síntesis activa de LAGN por las células HK-2.

Análisis de resultados

La LAGN se aisló originalmente de los neutrófilos humanos y se ha demostrado anteriormente que la medición de LAGN en la sangre es un medio excelente para distinguir las infecciones agudas provocadas por bacterias o virus. Estudios posteriores han descubierto que la LAGN también puede expresarse en otras células, tal como en el riñón, el hígado y el tejido epitelial, en ciertas condiciones y que la medición de LAGN en orina y plasma podría servir como biomarcador de la lesión renal aguda. El ejemplo 1 muestra que la configuración de los anticuerpos de un ensayo de

LAGN tiene un impacto sobre el rendimiento clínico del ensayo. Se identificaron varias formas de LAGN en la orina de pacientes con LRA. Este ejemplo muestra además que la forma monomérica y, en cierta medida, las formas heterodiméricas son las formas predominantes producidas por las células epiteliales tubulares, mientras que la forma dimérica parece exclusiva de los neutrófilos (véase la Fig. 6). La forma monomérica también fue producida por los neutrófilos. Un hallazgo interesante en el presente estudio son las diferencias en el reconocimiento de estas formas diferentes por los anticuerpos empleados, ya que las formas monomérica y dimérica que proceden de neutrófilos fueron identificadas por todos los anticuerpos monoclonales, así como por los anticuerpos policlonales. Esto se contrastó por la incapacidad prácticamente total del Mab697 para reconocer estas formas en la orina. Además, el Mab765 mostró una fuerte reacción a estas formas en los sobrenadantes de neutrófilos, pero solo un reconocimiento débil de la forma dimérica en la orina. Sin desear ceñirnos a la teoría, se cree que la causa son las diferencias en la exposición de los epítomos de las diferentes formas de la LAGN y, por lo tanto, las diferencias en las estructuras moleculares.

La presencia de diferentes formas moleculares de la LAGN en la orina y las diferencias en el reconocimiento de epítomos de los anticuerpos también se vieron reflejadas por las grandes diferencias en la cuantificación de LAGN en orina mediante los ensayos empleados. No solo fueron muy diferentes los niveles preoperatorios, a pesar de usar el mismo calibrador en los ensayos, sino también los cambios relativos después de la operación. Es evidente que los mayores aumentos en veces se produjeron con el ELISA que usaba anticuerpos policlonales solos o anticuerpos policlonales en combinación con Mab764 o Mab 765. Estos dos AcM también fueron los que reconocieron la mayoría de las formas en la orina en las Western Blot. Sin embargo, la combinación de estos dos AcM reconoció menos, lo que sugiere que las formas moleculares adicionales fueron captadas por los anticuerpos policlonales. De los experimentos de filtración en gel, parece que estas diferencias en el reconocimiento de diversas formas se relacionan principalmente con las diferencias en el reconocimiento de la LAGN monomérica, ya que solo un ensayo parecía reconocer la forma dimérica de manera diferente. Las diferencias no pudieron explicarse por los rendimientos analíticos generales de los ensayos, ya que todos mostraron unas sensibilidades, una imprecisión, una recuperación, etc., similares.

En base a la excreción fraccional de LAGN en humanos (CLAGN/CCr), la hibridación in situ en ratones, y al hecho de que la LAGN es una proteína de la fase aguda, los informes anteriores han reivindicado que la acumulación de LAGN en la orina podría proceder de la síntesis renal local, que comprende la fracción principal de LAGN urinaria, y de órganos distantes y células inmunitarias. Sin embargo, tales conclusiones se ven debilitadas por varias incertidumbres relacionadas con la gestión renal de la LAGN en términos de velocidad de filtración glomerular, reabsorción tubular y dilución en la orina, pero también por el hecho de que la hibridación in situ se realizó en ratones y que tales técnicas reflejan mal la capacidad de las células para producir proteínas. Sin embargo, nuestros hallazgos respaldan la idea de que las células epiteliales tubulares humanas tienen capacidad para producir LAGN, ya que la expresión de ARNm y la producción de proteínas fueron inducidas mediante varias condiciones relevantes para un riñón que vive en condiciones rigurosas o inflamatorias tal como se observa durante la circulación extracorpórea. Descubrimos que la citoquina IL-1R es el estímulo más potente, lo que es compatible con el trabajo de otros que usan la línea celular epitelial de pulmón. En muchos estudios anteriores se han observado niveles altos de proteínas secretoras de neutrófilos y de citoquinas como la IL- β y el TNF- α durante y después de la cirugía cardíaca. Por lo tanto, los presentes resultados demuestran que la LAGN está presente en la orina en muchas formas diferentes y que los ensayos para la cuantificación de LAGN en orina que tienen en cuenta esta diversidad resultan ventajosos. Por tanto, en una forma de realización, la invención se dirige a un ensayo que identifica preferentemente LAGN que procede del epitelio tubular, ya que la estructura molecular de la LAGN parece ligeramente diferente de la estructura de la LAGN procedente de neutrófilos. Tales ensayos son, por lo tanto, más específicos y sensibles para la detección de LRA y más beneficiosos para pacientes con riesgo de desarrollar una función renal deficiente.

Los métodos, dispositivos y kits de la presente invención se han descrito haciendo referencia a formas de realización específicas y el Ejemplo demuestra aspectos específicos de la invención. Sin embargo, se entenderá que un experto en la materia puede desarrollar formas de realización, aspectos, variaciones y modificaciones adicionales de la invención sin apartarse del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

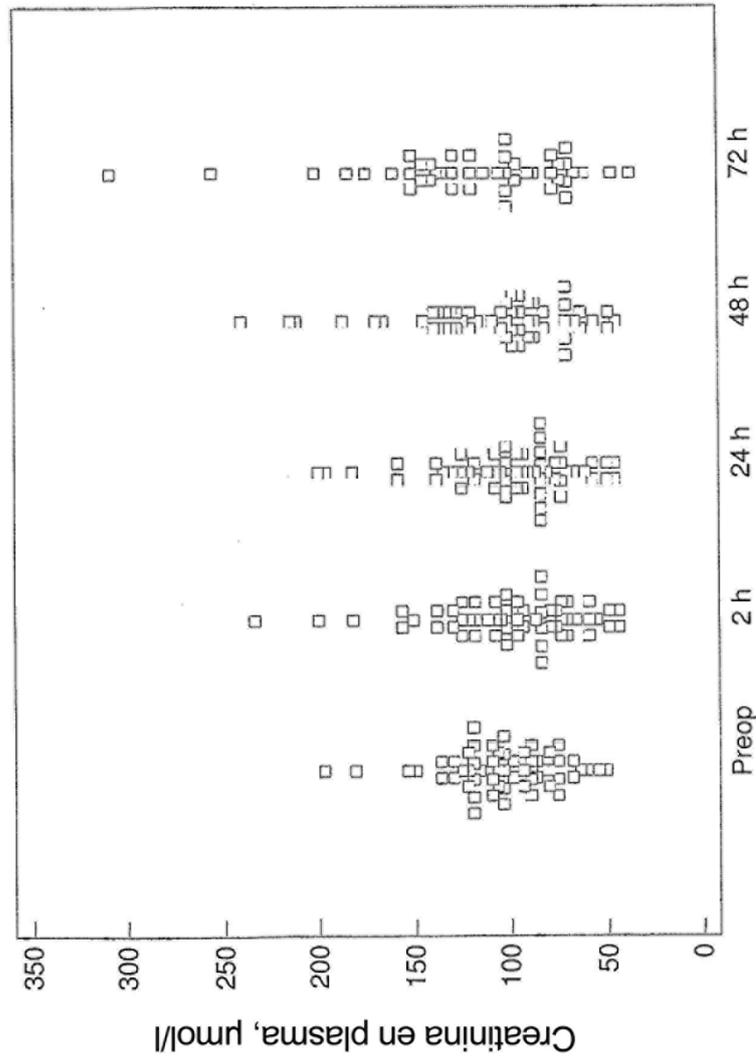
- 55 <110> Phadia AB
Venge, Per
- <120> Métodos, dispositivos y kits para detectar o monitorizar la lesión renal aguda
- 60 <130> 4007763-174371

<150> US 61/116,713
 <151> 2008-11-21
 5 <160> 4
 <170> Patentin versión 3.5
 <210> 1
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador para LAGN
 <400> 1
 tcacctcgt cctgttagc 20
 20 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador para LAGN
 <400> 2
 cgaagtcagc tcctgggtc 20
 30 <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador para beta-actina
 <400> 3
 40 ttctacaatgagctgcgtgtgg 22
 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para beta-actina
 50 <400> 4
 gtgtgaagg tctcaacat gat 23

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un origen de la proteína lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (LAGN) en una muestra de un individuo, que comprende
- 5 (a) determinar las cantidades relativas de las formas monomérica, dimérica y heterodimérica de la proteína LAGN en la muestra, y
(b) comparar las cantidades determinadas, donde una cantidad predominante de proteína LAGN monomérica y/o heterodimérica en comparación con la proteína LAGN dimérica indica proteína LAGN que procede del riñón del
- 10 individuo, mientras que una cantidad igual o predominante de proteína LAGN dimérica en comparación con la proteína LAGN monomérica o heterodimérica indica proteína LAGN que procede de los neutrófilos del individuo.
2. El método de la reivindicación 1, donde la muestra comprende orina.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, donde las cantidades respectivas de proteína LAGN en la muestra se determinan poniendo en contacto la muestra con un dispositivo de ensayo que incluye un anticuerpo monoclonal contra la LAGN.
4. El método de la reivindicación 1, donde las cantidades respectivas de proteína LAGN en la muestra se
- 20 determinan poniendo en contacto la muestra con un dispositivo de ensayo que incluye un anticuerpo policlonal contra LAGN.

FIG. 1



Tiempo después de la operación, horas

FIG. 2B

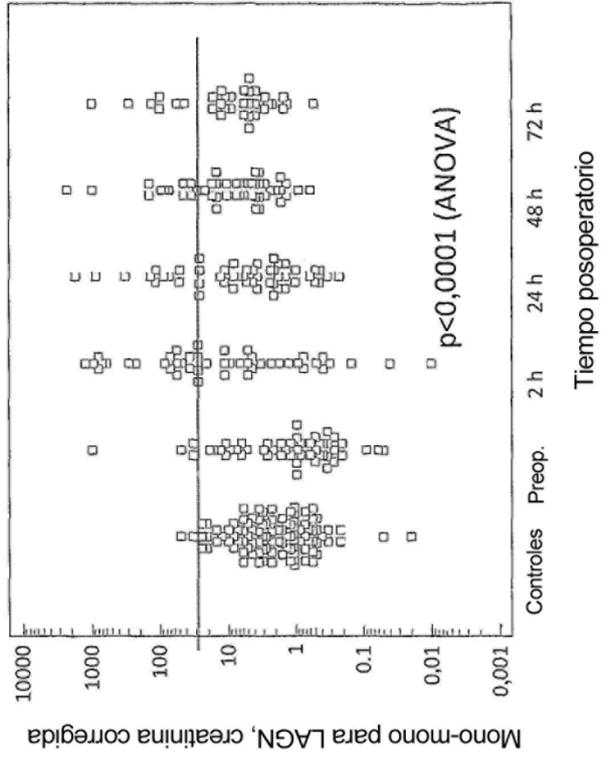
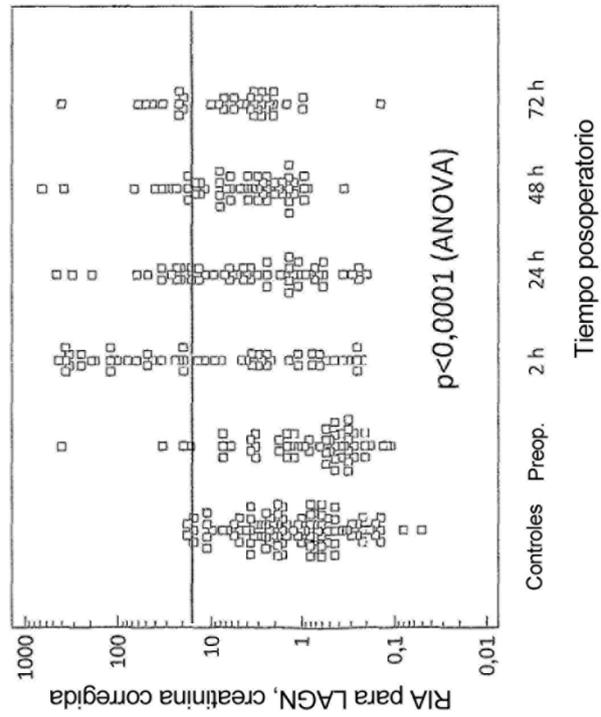


FIG. 2A



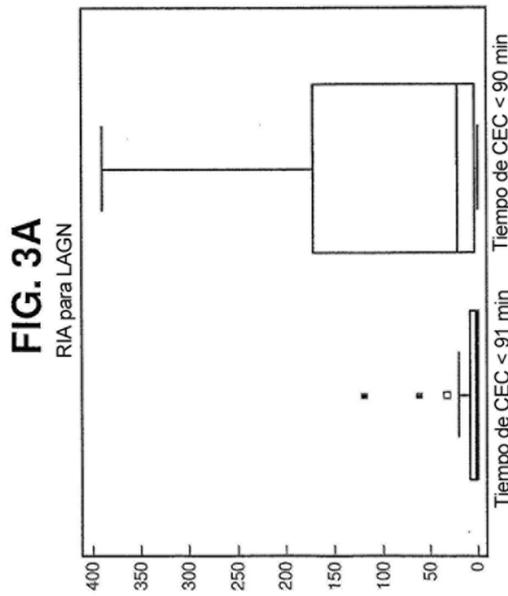
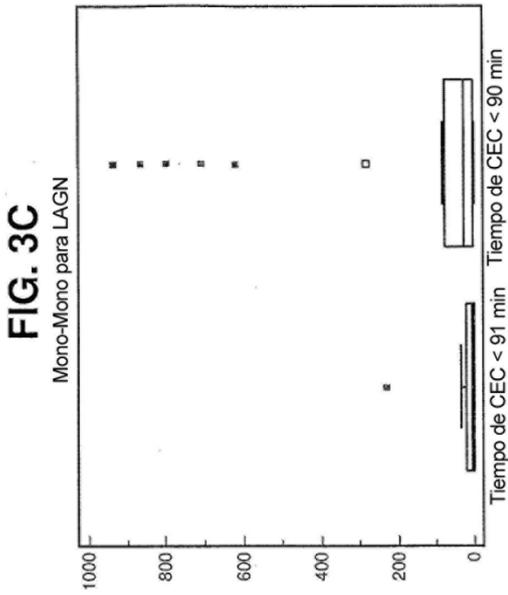


FIG. 3B

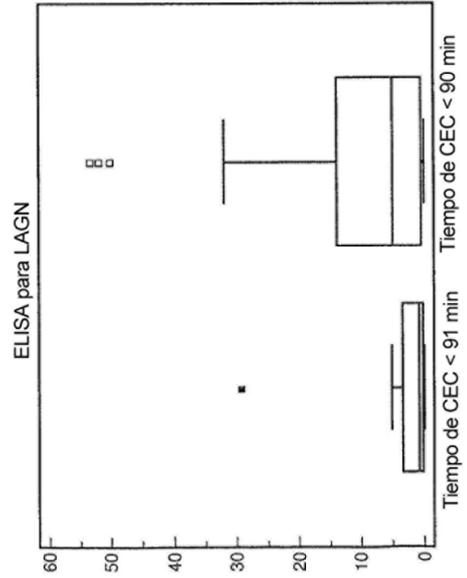


FIG. 4A

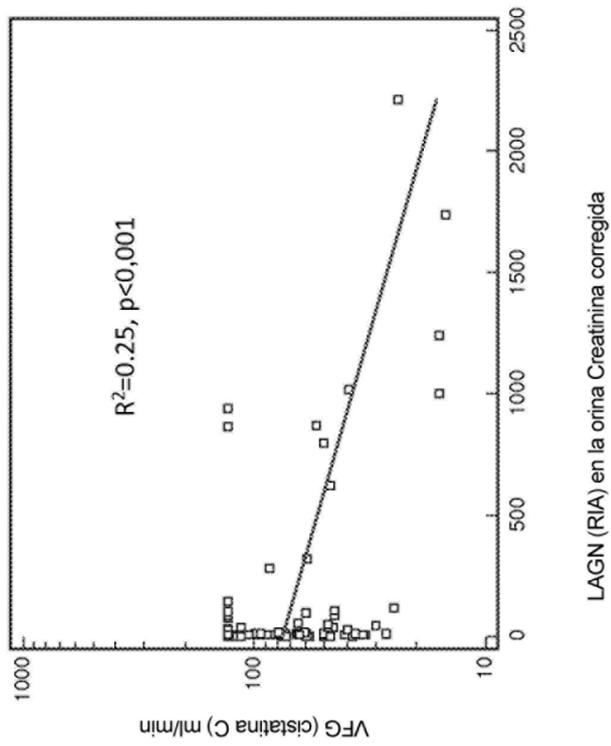


FIG. 4B

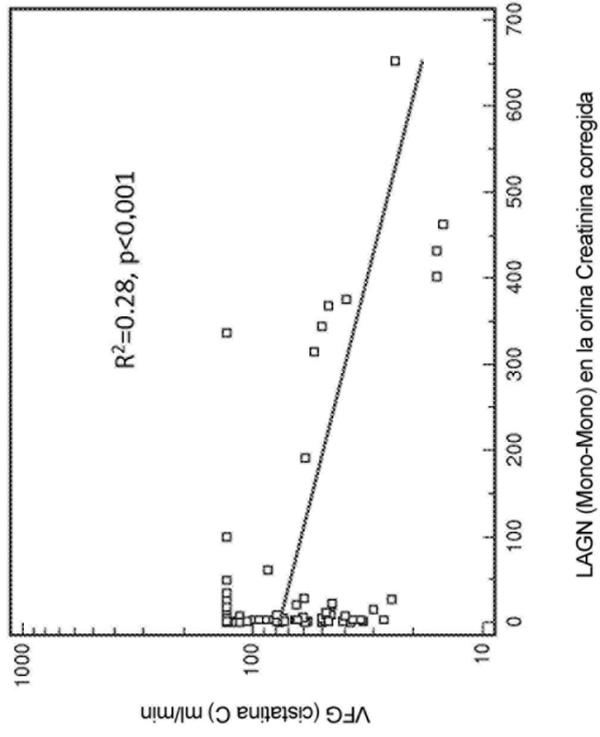


FIG. 5

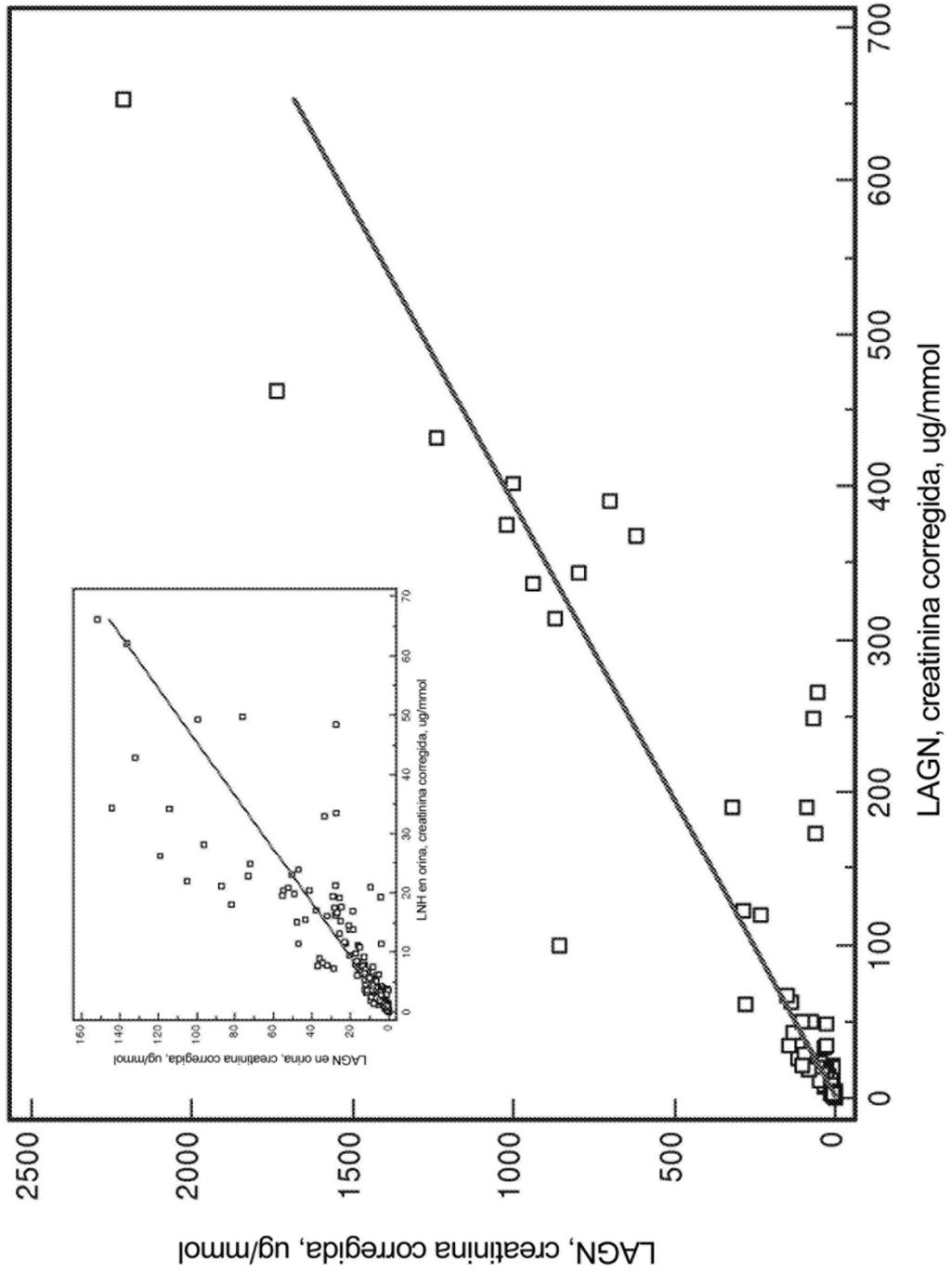


FIG. 6

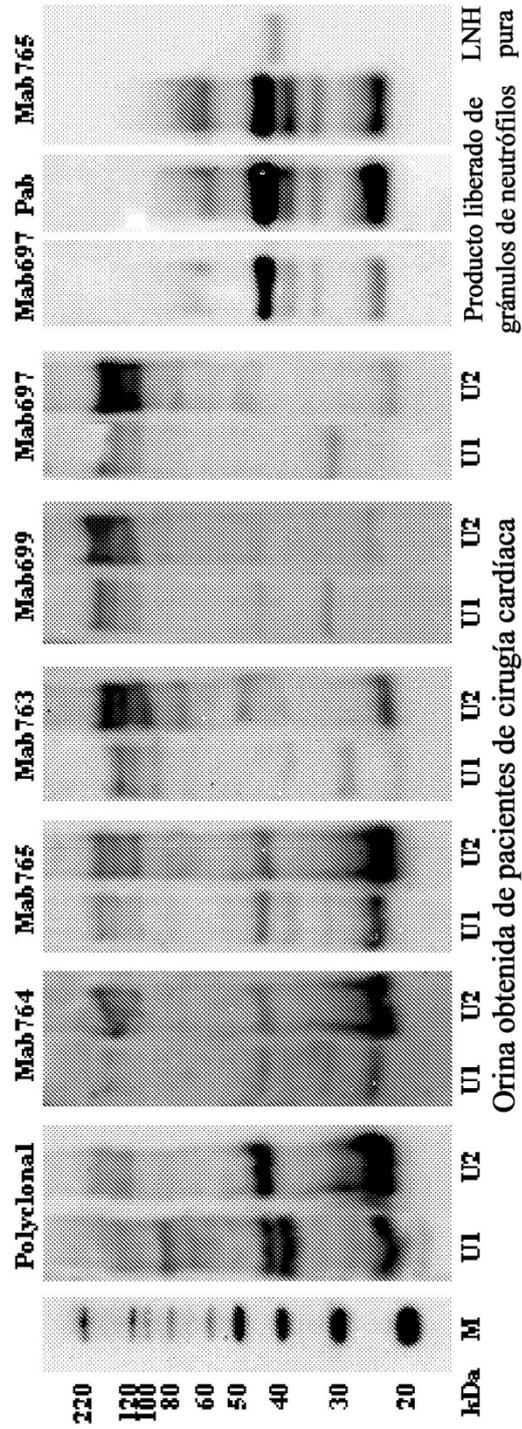


FIG. 7

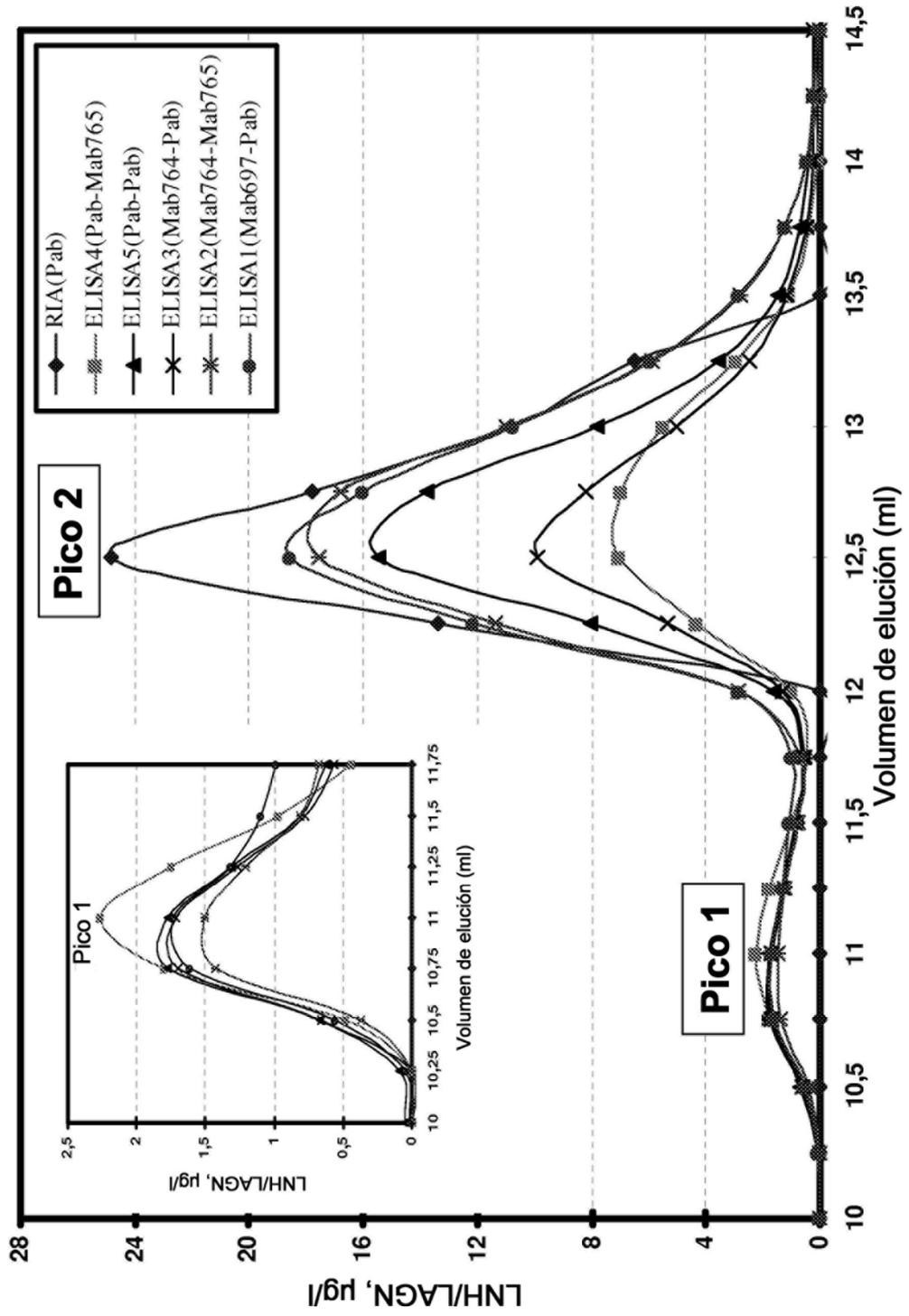


FIG. 8

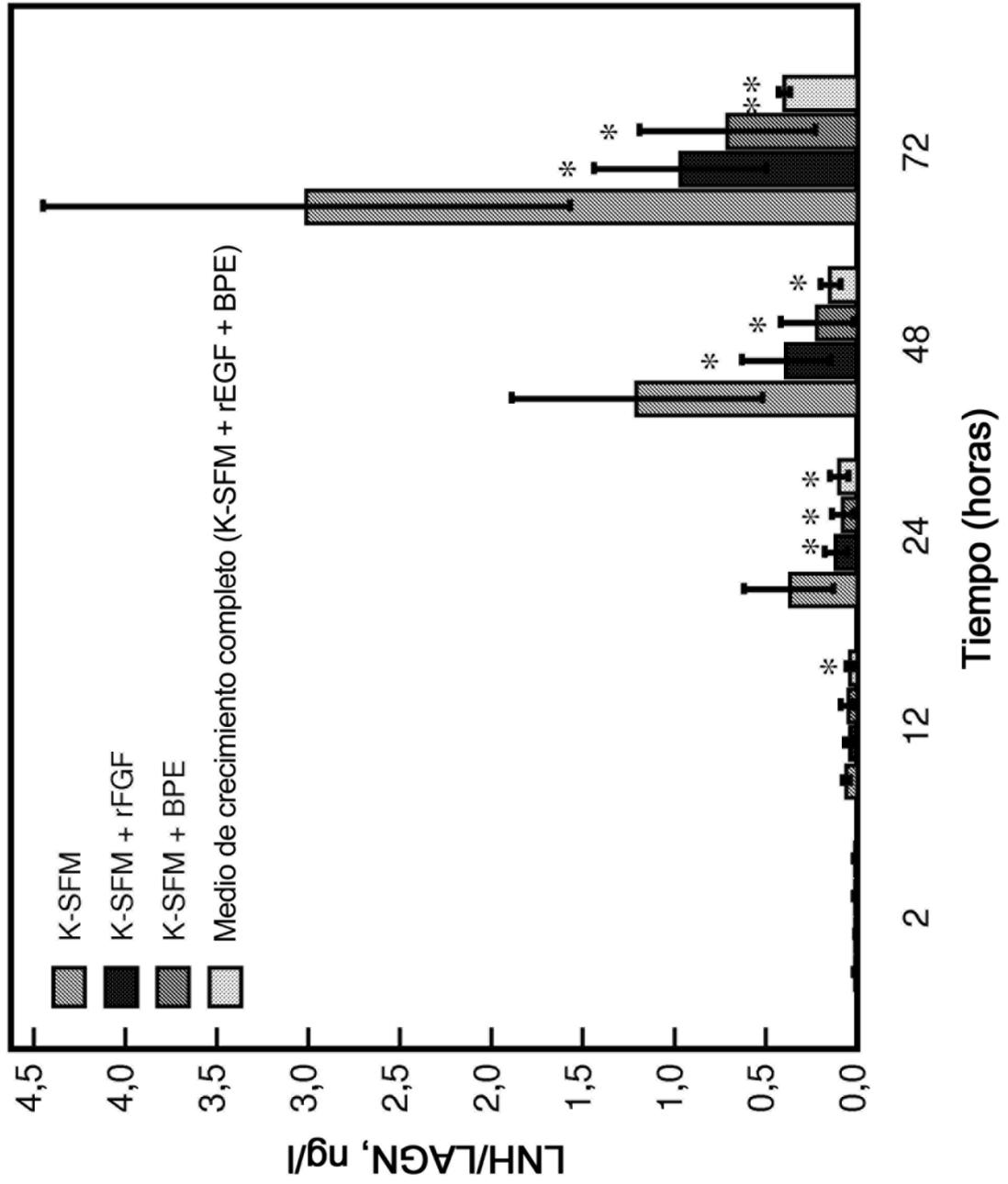


FIG. 9A

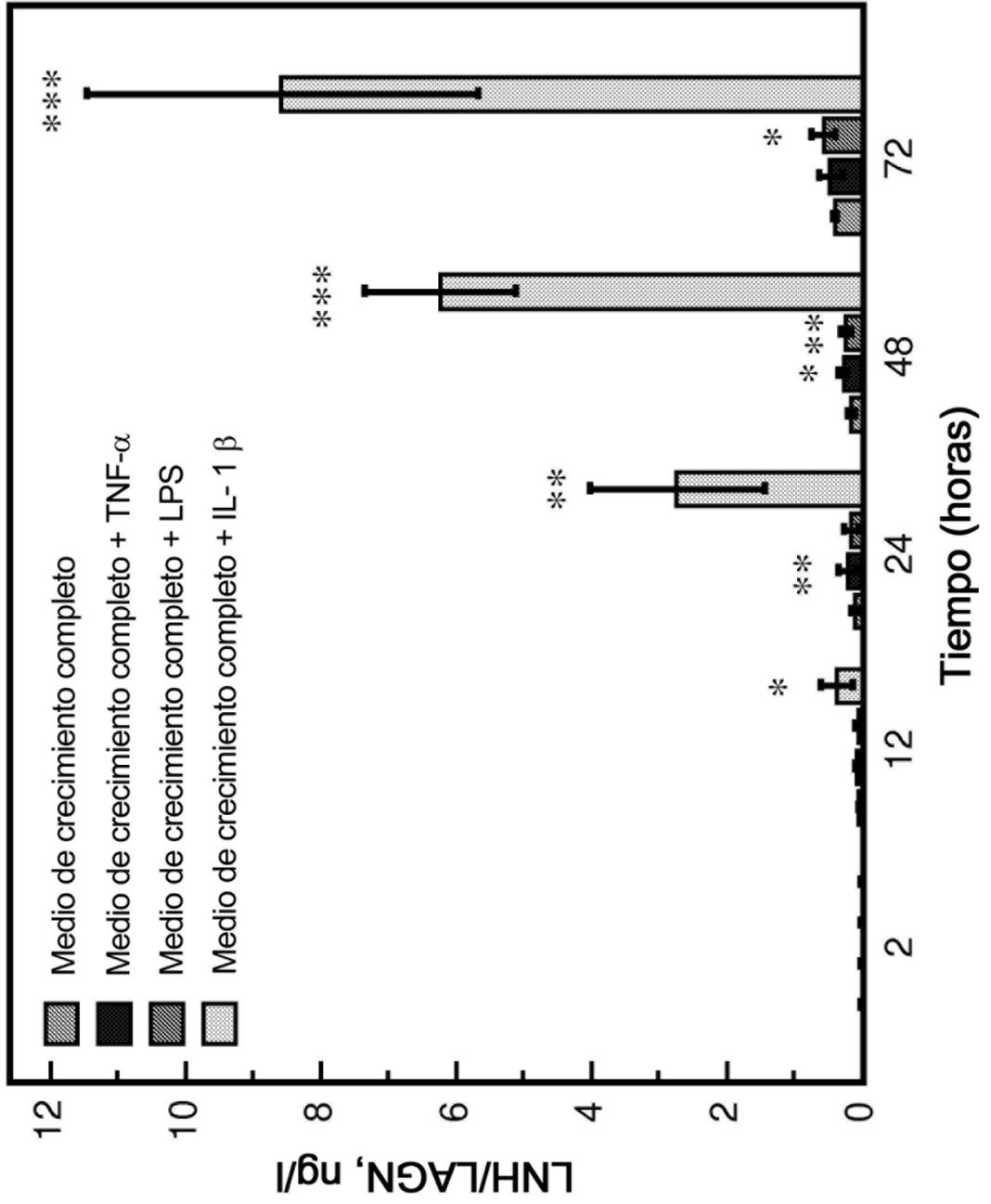


FIG. 9B

