(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 745 352**

(21) Número de solicitud: 201830849

(51) Int. CI.:

G01N 33/53 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

28.08.2018

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

28.02.2020

(71) Solicitantes:

FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (100.0%)
Av. de los Reyes Católicos 2
28040 Madrid ES

(72) Inventor/es:

SÁNCHEZ NIÑO, María Dolores;
ORTIZ ARDÚAN, Alberto;
SANZ BARTOLOMÉ, Ana;
PÉREZ GÓMEZ, María Vanessa y
FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Beatriz

(74) Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

(54) Título: **GDF15 EN ORINA COMO BIOMARCADOR DE DAÑO RENAL**

(57) Resumen:

GDF15 en orina como biomarcador de daño renal.

La presente invención protege y proporciona evidencias experimentales para los siguientes aspectos:

a. los niveles urinarios de GDF15 incrementados en varios modelos de daño renal, agudo y crónico, por tanto, constituyen un biomarcador de daño renal;

b. los niveles urinarios de GDF15 contribuyen a diferenciar la causa del daño renal en pacientes diabéticos, diferenciando entre pacientes diabéticos con nefropatía diabética y sin nefropatía diabética; y

c. los niveles urinarios de GDF15 identifican pacientes ya diagnosticados de ERC (enfermedad renal crónica) que tienen un altísimo riesgo de muerte, en concreto el 100% de los pacientes con GDF15 urinario >13,8ng/mg falleció durante un seguimiento medio de 30 meses.

ES 2 745 352 A1

DESCRIPCIÓN

GDF15 en orina como biomarcador de daño renal.

Campo de la técnica

La presente invención se refiere a un método y a un kit para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal que comprende analizar una muestra de orina obtenida de un paciente y determinar los niveles urinarios del factor 15 de crecimiento y diferenciación (GDF15).

Antecedentes de la invención

La enfermedad renal crónica (ERC) o insuficiencia renal crónica (IRC) es una pérdida progresiva (por tres meses o más) e irreversible de las funciones renales, cuyo grado de afección se determina con un filtrado glomerular (FG) <60 ml/min/1.73 m^2. Como consecuencia, los riñones pierden su capacidad para eliminar desechos, concentrar la orina y conservar los electrolitos en la sangre.

Los síntomas de un deterioro de la función renal son inespecíficos y pueden incluir una sensación de malestar general y una reducción del apetito.

A menudo, la ERC se diagnostica como resultado del estudio en personas en las que se sabe que están en riesgo de problemas renales, tales como aquellos con presión arterial alta o diabetes y aquellos con parientes con ERC. La insuficiencia renal crónica también puede ser identificada cuando conduce a una de sus reconocidas complicaciones, como las enfermedades cardiovasculares, anemia o pericarditis.

Las causas más comunes de ERC son la nefropatía diabética, hipertensión arterial, y glomerulonefritis. Juntas, causan aproximadamente el 75% de todos los casos en adultos de ERC. En la práctica clínica, la mayoría de las nefropatías progresan lentamente hacia la pérdida definitiva de la función renal. Históricamente, las enfermedades del riñón han sido clasificadas según la parte de la anatomía renal que está implicada:

- Vascular, incluye enfermedades de los grandes vasos sanguíneos, como estenosis de la arteria renal bilateral, y enfermedades de los vasos sanguíneos pequeños, como nefropatía isquémica, síndrome urémico hemolítico y vasculitis.
- Glomerular, abarcando a un grupo diverso y subclasificado en: Enfermedad glomerular primaria, como glomeruloesclerosis focal y segmentaria y nefropatía por IgA.
- Enfermedad glomerular secundaria, como nefropatía diabética y nefritis lupus.

- Túbulo intersticial, incluyendo enfermedad poliquística renal, nefritis tubulointersticial crónica inducida por drogas o toxinas, y nefropatía de reflujo.
- Obstructiva, por ejemplo, con piedras del riñón bilaterales y enfermedades de la próstata.

Los pacientes de ERC sufren de aterosclerosis acelerada y tienen incidencia más alta de enfermedades cardiovasculares, con un pronóstico más pobre. Inicialmente no presentan síntomas específicos y solamente puede ser detectada como un aumento en la creatinina del plasma sanguíneo. A medida que la función del riñón disminuye:

- La presión arterial está incrementada debido a la sobrecarga de líquidos y a la producción de hormonas vasoactivas que conducen a la hipertensión y a una insuficiencia cardíaca congestiva.
- La urea se acumula, conduciendo a la azoemia y en última instancia a la uremia (los síntomas van desde el letargo a la pericarditis y a la encefalopatía).
- El potasio se acumula en la sangre (lo que se conoce como hiperpotasemia), con síntomas que van desde malestar general a arritmias cardiacas fatales.
- Se disminuye la síntesis de eritropoyetina (conduciendo a la anemia y causando fatiga)
- Sobrecarga de volumen de líquido, los síntomas van desde edema suave al edema agudo de pulmón peligroso para la vida.
- La hiperfosfatemia, debido a la retención de fosfato que conlleva a la hipocalcemia (asociado además con la deficiencia de vitamina D3 activa) y al hiAerparatiroidismo secundario, que conduce a la osteoporosis renal, osteítis fibrosa y a la calcificación vascular.
- La acidosis metabólica, debido a la generación disminuida de bicarbonato por el riñón, conduce a respiración incómoda y después al empeoramiento de la salud de los huesos.

En las etapas iniciales de la ERC, cuando las manifestaciones clínicas y resultados de laboratorio son mínimos o inexistentes, el diagnóstico puede ser sugerido por la asociación de manifestaciones inespecíficas por parte del paciente, tales como fatiga, anorexia, pérdida de peso, picazón, náuseas, hipertensión, poliuria, nicturia, hematuria o edema. Otros síntomas son: oliguria, debilidad, , vómito, insomnios, calambres, palidez cutánea, xerosis, miopatía proximal, dismenorrea y/o amenorrea, atrofia testicular, impotencia, déficit cognitivos o de atención, confusión, somnolencia, obnubilación y coma. Sin embargo, aún existe la necesidad de identificar y validar nuevos biomarcadores de daño renal, más precisos, cuya determinación además sea rápida, sencilla y sin necesidad de biopsiar al paciente y que permitan determinar la causa del daño renal, más concretamente del daño renal crónico.

Además, se hace notar que durante la última década se han desarrollado modelos conceptuales separados para la ERC y el fracaso renal agudo (FRA; también denominado Lesión Renal Aguda o en inglés, Acute

Kidney Injury; AKI) que facilitan enfoques organizados para la investigación y los ensayos clínicos. Sin embargo, estudios epidemiológicos y mecanicistas recientes indican que los dos síndromes no son entidades diferentes sino que están estrechamente interconectados—la ERC es un factor de riesgo de FRA, y el FRA es un factor de riesgo para el desarrollo de la ERC; a su vez, ambos síndromes son factores de riesgo de enfermedad cardiovascular. Chawla LS, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. N Engl J Med. 2014 Jul 3;371(1):58-66 Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease . Kidney International Supplements 2013;3: 1-150. En este sentido, la presente invención proporciona nuevos biomarcadores de daño renal, tanto de ERC como de fracaso renal agudo, dichas biomarcadores han demostrado ser útiles para diagnosticar y pronosticar ambos síndromes en virtud de la interconexión que parecen tener ambos.

Breve descripción de la invención

En base a los resultados experimentales aportados a lo largo de la descripción, la presente invención versa sobre los siguientes aspectos expuestos de forma resumida y general:

a. los niveles urinarios de GDF15 están alterados, en concreto se encuentran incrementados, en varios modelos de daño renal, tanto agudo y crónico y, por tanto, constituyen un biomarcador de daño renal;
b. los niveles urinarios de GDF15 contribuyen a diferenciar la causa del daño renal en pacientes diabéticos, diferenciando entre pacientes diabéticos con nefropatía diabética y sin nefropatía diabética; y
c. los niveles urinarios de GDF15 identifican pacientes ya diagnosticados de ERC que tienen un altísimo riesgo de muerte, en concreto el 100% de los pacientes con GDF15 urinario >13,8ng/mg fallecieron durante un seguimiento medio de 30 meses.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Correlaciones de GDF15 en orina con FG y Albuminuria (coc MAU/Cr = cociente microalbuminuria/creatinina).

Figura 2. GDF15 en orina de pacientes diabéticos con riñón nativo, es decir aquel riñón que no ha sido trasplantado, con y sin nefropatía diabética.

Figura 3. Árbol de clasificación de evolución de los pacientes: diálisis, vivo o muerto.

Figura 4. Curva ROC de GDF15 en orina, mortalidad, diálisis y muerte + diálisis.

Figura 5. Comportamiento de GDF15 en suero como predictor de mortalidad.

Figura 6. Curva ROC de GDF15 en orina como biomarcador de nefropatía diabética en pacientes diabéticos. (N=13)

Descripción de la invención

Los autores de la presente invención, en un estudio transcriptómico de un modelo preclínico de daño renal determinaron que el gen de la familia de GDF más sobre expresado fue el factor 15 de crecimiento y diferenciación (ver GDF 15 en la tabla 1 mostrada abajo). Es más, los autores de la presente invención confirmaron que dicho aumento de expresión de GDF15 se producía en varios modelos de daño renal agudo y crónico, de diversas etiologías (Tablas 2, 3 y 4).

Tabla 1. Expresión renal de ARNm de genes de la familia GDF en el fracaso renal agudo experimental inducido por ácido fólico, analizado por transcriptómica, técnica de Arrays. Datos expresados como media ± error estándar de la media. Los niveles de mRNA fueron analizados a las 72h de la inducción del daño.

Gen	FRA (UA)	Control (UA)	Ratio FRA/Control	Valor de p	Valor de p ajustado (FDR)
Gdf15	281,89 ± 63,79	85,94 ± 5,25	3,28	0,0006	0,0149
Gdf3	46,23 ± 2,12	35,67 ± 0,57	1,30	0,0032	0,0346
Gdf11	105,80 ± 5,54	88,53 ± 0,97	1,20	0,0235	0,1162
Gdf6	26,71 ± 2,20	23,59 ± 0,19	1,13	0,1792	0,4364
Gdf5	24,36 ± 1,53	21,84 ± 0,23	1,12	0,1588	0,4049
Gdf2	26,34 ± 1,66	25,21 ± 1,49	1,04	ns	ns
Gdf9	30,44 ± 1,69	29,53 ± 1,87	1,03	ns	ns

Gdf1	57,95 ± 5,92	56,47 ± 3,22	1,03	ns	ns
Gdf10	165,12 ± 25,36	182,70 ± 18,85	0,90	ns	ns
Gdf7	94,76 ± 9,31	110,05 ± 3,27	0,86	ns	ns

Tabla 2. Expresión renal de ARNm de genes de la familia GDF en el modelo de daño renal por proteinuria (inducido por administración BSA o Albúmina de suero bovino), Analizado por Transcriptómica, técnica de RNA-seq. Los niveles de mRNA fueron analizados a los 7 días de la inducción del daño.

Gen	Ratio BSA/Control	Valor de p
Gdf15	1,17	0,0302
Gdf1	1,08	0,21
Gdf3	1,05	0,0078
Gdf11	1,00	0,95
Gdf5	1,00	1,00
Gdf9	-1,01	0,59
Gdf2	-1,02	0,53
Gdf10	-1,29	0,038

Tabla 3. Expresión renal de ARNm de genes de la familia GDF en inflamación, analizado por transcriptómica, técnica RNA-seq. Datos expresados como media ± error estándar de la media. Los niveles de mRNA fueron analizados a los 7 días de la inducción del daño mediante la inyección de la citoquina inflamatoria Tweak.

Gen	Control (UA)	Tweak (UA)	Ratio Tweak/Control	Valor de p	Valor de p ajustado (FDR)
Gdf15	64,97 ± 10,84	39,87 ± 2,83	0,614	0,0003	0,026
Gdf10	117,17 ± 4,66	156,82 ± 27,79	1,338	0,0247	0,42
Gdf11	26,89 ± 6,19	30,31 ± 1,89	1,127	ns	ns

Gdf3	7,91 ± 0,57	5,79 ± 0,63	0,733	ns	ns
Gdf7	3,35 ± 1,77	6,91 ± 1,91	2,065	ns	ns
Gdf1	2,12 ± 0,45	3,76 ± 1,21	1,774	ns	ns
Gdf9	2,07 ± 0,59	2,57 ± 0,32	1,238	ns	ns
Gdf5	2,04 ± 0,56	2,03 ± 1,16	0,996	ns	ns
Gdf6	1,03 ± 0,03	1,58 ± 0,88	1,525	ns	ns
Gdf2	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,000	ns	ns

Tabla 4 Expresión GDF15 ARNm (UA) en el riñón completo de ratones MRL/lpr 6 semanas (control) vs ratones MRL/lpr 14-18 semanas (nefritis lúpica). Datos expresados como media ± error estándar de la media. NL: nefritis lúpica

	GDF15 ARNm (UA)	Edad de muerte (semanas)	Proteinuria*	Días con proteinuria 4	Días con proteinuria 3 y 4	Días con proteinuria 2, 3 y 4
Control 1	22,17	6	1	0	0	0
Control 2	12,24	6	1	0	0	0
Control 3	6,05	6	1	0	0	0
Control 4	23,58	6	1	0	0	0
NL 1	8,84	14	4	2	2	2
NL 2	259,50	15,5	4	7	10	10
NL 3	38,13	18	3	0	3	10
NL 4	51,00	18	2	0	0	10
NL 5	84,92	18	3	0	13	27
NL 6	93,52	18	4	15	15	19
NL 7	123,19	18	4	7	30	30

NL 8	237,47	18	4	16	16	20

*Escala semicuantitativa de 1+ a 4+

En base a estos resultados, se estableció que GDF15 era un biomarcador de enfermedad renal, aumentando la expresión de este marcador en el riñón en diversos modelos de daño renal agudo y crónico. Además, se confirmó que GDF15 aumenta en orina de pacientes con daño renal agudo. Esto se ve confirmado tal y como se ilustra a continuación:

Niveles de GDF15 en orina de pacientes con fracaso renal agudo (AKI)

	GDF nanogr/mgr creatinine
Controles	7,0
	30,6
AKI	

n= 20 AKI

n= 7 Controles

Además, con el objeto de poder confirmar estos resultados también en daño renal crónico, se realizó un estudio prospectivo, en el que se analizó mediante ELISA los niveles de e GDF15 en muestras de orina de 73 pacientes y plasma de 82 pacientes, que se sometieron a biopsia renal entre septiembre 2012 y marzo 2017, en el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz. Todos ellos tenían un diagnóstico de ERC basado en el filtrado glomerular y la albuminuria. Estos valores fueron correlacionados con datos clínicos basales y con seguimiento de los pacientes a los 29 ± 17 meses. Tal y como se puede comprobar en la tabla 5, los niveles urinarios de GDF15 en orina estaban aumentados de forma significativa en pacientes con ERC, en comparación con controles sanos.

Tabla 5 Valores de GDF15 en orina, pacientes y controles. Datos expresados como media ± desviación estándar.

GDF15	Pacientes	Controles	P
Orina ng/mg	11,2 ± 7,7	2,9 ± 1,7	<0,001

(Pacientes=73 Sujetos con ERC a los que se iba a hacer una biopsia renal)

(Controles= 7 Sujetos control)

La ERC se diagnostica en base a niveles de Filtrado Glomerular (FG) y Albuminuria (A), lo que a su vez identifica a personas con alto riesgo de muerte prematura. Los niveles de GDF15 en orina no se

modifican en función del Filtrado Glomerular (FG) ni Albuminuria (A) (tablas 6 y 7). En la Figura 1 se muestra la correlación con estas variables.

Tabla 6 GDF15 orina por categoría de ERC dependiente de FG: G1, G2, G3 y G4-G5. Datos expresados como media ± desviación estándar.

GDF15	G1	G2	G3	G4-G5	p
GDF15 orina ng/mg	9,96 ± 5,39	9,33 ± 6,32	12,37 ± 10,16	11,48 ± 5,97	ns

Donde G1, G2, G3, G4-G5 son los distintos niveles de estratificación ERC en función de FG (filtrado glomerular). Las categorías G1- a G5 provienen de un consenso internacional (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney International Supplements 2013;3: 1-150) y se definen de la siguiente manera: G1 (≥90); G2 (60-89), G3a (45-59), G3b (30-44), G4 (15-29), G5 (<15). Los números entre paréntesis se refieren a filtrado glomerular (FG) expresado en ml/min/1.73 m^2. Además, nos gustaría señalar que en la página 52 de la referencia Rev Nefrol Dial Traspl. 2017; 37 (1): 48-61), se describe la estratificación de la nefropatía diabética en función de niveles FG y/o albuminuria (página 52).

Tabla 7 GDF15 orina por categoría de ERC dependiente de Albuminuria: A1, A2 y A3. Datos expresados como media ± desviación estándar.

GDF15	A1	A2	A3	P
GDF15 orina ng/mg	13,37 ± 4,59	8,58 ± 4,78	11,49 ± 8,62	Ns

Donde A1, A2, A3 son los distintos niveles de estratificación ERC en función de A (albuminuria). Las categorías A1 a A3 provienen de un consenso internacional (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney International Supplements 2013;3: 1-150) y se definen de la siguiente manera: A1 (<30); A2 (30-300), A3 (>300). Los números entre paréntesis se refieren a cociente albuminuria: creatinuria (creatinina en orina) expresado en mg/g. Hacemos notar que los valores de diferentes analitos en orina se normalizan por mg o g de creatinina en orina, ya que la eliminación urinaria de creatinina es constante en 24 h, como ejemplifica las unidades de albuminuria (mg/g de creatinuria), como indican las guías internacionales (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney International Supplements 2013;3: 1-150). A lo largo del texto, hemos

normalizado de la misma manera la eliminación urinaria de GDF15, expresando los valores en ng de GDF15 urinario por mg de creatinina urinaria (ng/mg). En este sentido, se desaconseja expresar las proteínas (albúmina, GDF15) en orina por unidad de volumen (vg mg/ml), ya que el volumen depende fundamentalmente de la ingesta de agua y varía de minuto a minuto (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease . Kidney International Supplements 2013;3: 1-150; Ortiz A, Sanchez-Niño MD, Sanz AB. The meaning of urinary creatinine concentration. Kidney Int. 2011 Apr;79(7):791).

Fruto de los resultados del estudio prospectivo se identificaron los siguientes aspectos:

1. Existe una asociación entre niveles de GDF15 urinario con el diagnóstico de nefropatía diabética en pacientes con diabetes.

Se observó que la nefropatía diabética es la causa de ERC en la que existen mayores niveles de GDF15 en orina con respecto a otras causas (tabla 8)

Tabla 8. GDF15 en suero ng/ml y orina ng/mg según diagnósticos, organizado en orden de frecuencia del diagnóstico. Datos expresados como media ± desviación estándar (n). Los valores obtenidos de uno o dos pacientes se indican en color gris. Los datos obtenidos de un paciente no tienen desviación estándar por tratarse de un solo valor.

Diagnósticos		**GDF15 suero ng/ml**	**GDF15 orina ng/mg**
Grandes categorías	Glomerulonefritis inflamatoria primaria o secundaria	2,8 ± 2,1 (24)	12,9 ± 7,3 (21)
	Glomerulonefritis no inflamatoria primaria o secundaria	2,3 ± 1,5 (32)	10,3 ± 9,6 (28)
	Nefropatía tubulointersticial crónica	1,9 ± 0,9 (4)	10,4 ± 3,2 (4)
	Necrosis tubular aguda	2 (1)	
	ERC sin causa evidente	1,92 (1)	11,07 (1)
	Rechazo de trasplante	2,5 ± 1,4 (5)	15,2 ± 8,8 (4)
	Trasplante, otra	2,5 ± 2 (11)	10 ± 4,2 (11)
	Otra	2,5 ± 1,5 (4)	9 ± 5,6 (4)
Diagnósticos específicos	Glomérulo Esclerosis Focal y	1,8 ± 0,7 (8)	5 ± 1,7 (8)

	Segmentaria		
	Nefropatía IgA	2,5 ± 2,5 (7)	9,8 ± 5,6 (7)
	Nefropatía Diabética	4,1 ± 1,4 (6)	23,4 ± 15,7 (5)
	Nefropatía Lúpica III o IV	3,3 ± 2,9 (5)	14,1 ± 8,5 (5)
	Nefropatía Membranosa	1,6 ± 0,3 (5)	7,8 ± 5,2 (5)
	Nefropatía por depósito	3,1 ± 2,1 (5)	17,38 ± 8 (5)
	Rechazo Trasplante	2,5 ± 1,4 (5)	15,2 ± 8,8 (4)
	Vasculitis	1,5 ± 1,1 (4)	11,8 ± 8,9 (3)
	Nefroangiosclerósis	1,9 ± 0,8 (4)	8,5 ± 6,4 (3)
	Nefropatía Lúpica II o V	2 ± 1,2 (4)	14,1 ± 3,2 (3)
	Nefropatía de Cambios Mínimos	3,6 ± 2,3 (3)	6,8 (1)
	Necrosis Tubular Aguda	2 (1)	
	Glomerulonefritis Mesangial	0,8 ± 0,3 (2)	5 ± 6,4 (2)
	Nefritis Túbulo Intersticial Crónica	1,3 ± 0,7 (2)	7,8 ± 0,8 (2)
	Trasplante otros	2,7 ± 1,9 (11)	10,3 ± 4,4 (11)
	Otros	2,5 ± 1,4 (10)	9,9 ± 3,6 (9)

Tabla 9. GDF15 en orina en pacientes diabéticos con riñones nativos (no trasplantados) con nefropatía diabética versus con otros diagnósticos diferentes de nefropatía diabética

	GDF15 orina ng/mg	**p**
Nefropatía Diabética	30,5 ± 17,4	**0,003**
No Nefropatía Diabética	9,7 ± 6	

Asimismo, se observó que los pacientes con diagnóstico de diabetes y de ERC (Enfermedad renal crónica) basado en el filtrado glomerular y la albuminuria, que fueron diagnosticados de nefropatía diabética en la biopsia comparados con los pacientes biopsiados con diagnóstico de diabetes y de ERC (Enfermedad renal crónica) basado en el filtrado glomerular y la albuminuria sin nefropatía diabética en la biopsia, tenían niveles significativamente más altos de GDF15 en orina (figura 2 y tabla 9), por lo que los valores de GDF15 urinario contribuyen a diferenciar la causa del daño renal en pacientes diabéticos con ERC (Enfermedad renal crónica) basado en el filtrado glomerular y la albuminuria.

2. Existe una asociación entre niveles de GDF15 urinario con mortalidad

Se realizaron árboles de clasificación para valorar si los valores de GDF15 en suero y orina podían predecir la evolución de pacientes con supervivencia sin diálisis, supervivencia con diálisis o muerte. De acuerdo a esta clasificación, la única variable que predijo la evolución de los pacientes fue el valor de GDF15 en orina, que si era mayor de 19.9 ng/g se asociaba a aumento de mortalidad: mortalidad 83% entre pacientes con valores de GDF15 urinario ≥ 20 ng/g de creatinina en orina (figura 3). Adicionalmente, para valorar el aporte de GDF15 sobre la evolución de los pacientes, se realizaron modelos de regresión logística (tabla 10).

Tabla 10. Modelos de regresión logística para predecir evolución: muerte, diálisis o vivo, valoradas por separado las variables GDF15 en suero y orina.

Variables		Coeficientes no estandarizados B (error estándar)	p
Variable dependiente: vivos (vivo + diálisis)			
Variables independientes incluidas	Edad	-0,154 (0,06)	0,01
	GDF15 suero	-1,001 (0,375)	0,008
Variables independientes excluidas	Sexo	0	0,05
	FG basal	0	0,741
	MAU/Cr basal	0	0,518
Variable dependiente: vivos (vivo + diálisis)			
Variables independientes incluidas	Edad	-0,142 (0,078)	0,069
	GDF15 orina	-0,395 (0,182)	0,03
Variables independientes excluidas	Sexo	0	0,085
	FG basal	0	0,274
	MAU/Cr basal	0	0,070

Unidades en las que fueron medidas las variables: GFF15 suero ng/ml, GDF15 orina ng/ml, Edad (años), Sexo (mas/fem), MAU/Cr (albuminuria:creatinuria) mg/gr, FG ml/min/1,73m^2.

En todos los modelos: multivariables, árboles de clasificación y regresión logística, se aprecia una relación de GDF15 en orina con mortalidad. En relación con el GDF15 en suero, solo apreciamos relación con mortalidad en el modelo de regresión logística, esto podría deberse a que en este último el GDF15 en suero no fue incluido en las variables independientes al mismo tiempo que el GDF15 en orina, como en los modelos de árboles de clasificación. Esto indica que la relación con mortalidad es más fuerte con los niveles de GDF15 en orina. Para demostrar esto realizamos dos modelos multivariables adicionales en los que incluimos a la vez como variables independientes: GDF15 en suero, GDF15 en orina y edad,

que fueron las variables asociadas con mortalidad en la tabla 10. En estos modelos se aprecia como GDF15 en suero queda excluido al ser comparado con GDF15 en orina como predictor de mortalidad (ver tabla 11).

Tabla 11 . Modelos de regresión logística para predecir evolución: muerte, diálisis o vivo, valoradas a la vez las variables GDF15 en suero y orina.

Variables		Coeficientes no estandarizados B (error estándar)	p
Variable dependiente: vivos (vivo + diálisis)			
Variables independientes incluidas	GDF15 orina	-0,395 (0,182)	0,03
	Edad	-0,141 (0,78)	0,07
Variables independientes excluidas	GDF15 suero	0	0,814
Variable dependiente: muerto + diálisis			
Variables independientes incluidas	GDF15 orina	0,191 (0,06)	0,002
Variables independientes excluidas	GDF15 suero	0	0,130
	Edad	0	0,217

Unidades en las que fueron medidas las variables: GFF15 suero ng/ml, GDF15 orina ng/ml, Edad (años).

Dada esta importante relación entre GDF15 en orina y los eventos no deseados de mortalidad, se realizaron unas curvas ROC para representar gráficamente la sensibilidad y especificidad que tiene GDF15 en orina para predecir el estado final del paciente: muerte, diálisis o muerte + diálisis (figura 4). Las curvas ROC obtenidas indican que GDF15 tiene un buen índice de calidad diagnóstica para predecir mortalidad, con un área bajo la curva (AUC) de 0,952 (IC 95% 0,9-1; p <0,001). Se utilizó el índice de Youden para decidir el valor de corte que maximice la diferencia entre sensibilidad y (1 – especificidad). Mediante este índice se determinó el punto de corte: GDF15 en orina 13,83 ng/mg. Lo que indica que el test es positivo si el valor es superior de 13,83 ng/mg con una sensibilidad de 100% y especificidad de 81%. Los valores de área bajo la curva son menores para predecir mortalidad + diálisis: AUC 0,777 (IC 95% 0,6-0,9; p=0,001) y no fue significativo para predecir diálisis por separado: AUC 0,541 (IC 95% 0,3-0,7; p=0,695).

Por lo tanto, y en base a los dos análisis estadísticos explicitados en este apartado podemos concluir que a mayor GDF15 en orina, mayor mortalidad. Explicar que la forma tradicional de identificar un punto de corte es la curva ROC que identifica el punto óptimo asociado a mayor sensibilidad y especificad. El

punto de corte de 13,8 ng/mg identificado en el párrafo precedente, se trata del punto de corte ideal para identificar a todos los pacientes de alto riesgo. El punto de corte de 19.9 ng/mg mencionado en los párrafos iniciales de esta sección, solo identifica a alrededor del 80% de aquellos pacientes que van a morir.

En cualquier caso y dados estos hallazgos, podemos afirmar que los niveles urinarios de GDF15 identifican pacientes ya diagnosticados de ERC que tienen un altísimo riesgo de muerte. En concreto el 100% de los pacientes con GDF15 urinario >13,8ng/mg falleció durante un seguimiento medio de 30 meses.

Por lo tanto, y en base a los resultados experimentales aportados hasta el momento, podemos concluir que:

a. los niveles urinarios de GDF15 se incrementan en varios modelos de daño renal agudo y crónico y, por tanto, constituyen un biomarcador de daño renal;
b. los niveles urinarios de GDF15 contribuyen a diferenciar la causa del daño renal en pacientes diabéticos, diferenciando entre pacientes diabéticos con nefropatía diabética y sin nefropatía diabética; y
c. los niveles urinarios de GDF15 identifican pacientes ya diagnosticados de ERC que tienen un altísimo riesgo de muerte, en concreto el 100% de los pacientes con GDF15 urinario >13,8ng/mg falleció durante un seguimiento medio de 30 meses.

Por otro lado, la elección de determinar niveles urinarios de GDF15 en vez de niveles séricos de GDF15 no es causal, tal y como se muestra en los ejemplos. GDF15 es una proteína pequeña de 25KDa que atraviesa fácilmente la barrera de filtración glomerular. Sin embargo, en condiciones normales, las células tubulares proximales debieran reabsorber el GDF15 filtrado, y no debiera aparecer en orina. La existencia de GDF15 en orina podría deberse a las siguientes razones:

- Que exista una exagerada producción sistémica de GDF15 que exceda la capacidad de reabsorción de las células tubulares.

- Que el GDF15 urinario provenga de un aumento de síntesis a nivel local, secundario al daño renal, al igual que aumenta la síntesis de otras citoquinas y mediadores en el contexto del estado inflamatorio de la uremia.

Sin perjuicio de lo anterior, determinar niveles urinarios de GDF15 en vez de niveles séricos de GDF15, proporciona (ver ejemplo 1) valores notablemente más altos de sensibilidad y especificidad como

biomarcador predictor de mortalidad a 30 meses en pacientes que padecen de ERC. Los pacientes con ERC tienen un alto riesgo de mortalidad prematura. Sin embargo, dentro de la ERC diferentes pacientes pueden tener un riesgo diferente de mortalidad prematura, la incapacidad para identificar estos pacientes de altísimo riesgo tiene un impacto negativo sobre la selección de pacientes para ensayos clínicos. En general, los ensayos clínicos en pacientes con ERC que tienen un punto final primario de eventos graves o mortalidad han fracasado. En al menos algunos de ellos, la razón del fracaso fue un escaso enriquecimiento en paciente de alto riesgo. La posibilidad que brindan los niveles de GDF15 en orina de identificar pacientes con altísimo riesgo de muerte puede ayudar a diseñar ensayos clínicos centrados en estos pacientes que permitan identificar nuevos tratamientos que disminuyan la mortalidad. En este sentido, hemos de recalcar que GDF15 en orina predijo la alta mortalidad en pacientes seguidos en unidades de nefrología, esto es en pacientes tratados, según el estado del arte actual. Ello implica que los tratamientos actuales son incapaces de evitar la mortalidad asociada a altos niveles de GDF15 en orina.

Por otro lado, determinar niveles urinarios de GDF15 en vez de niveles séricos de GDF15, permite diferenciar entre pacientes diabéticos que sufren de nefropatía diabética de aquellos que no cuando los niveles séricos de GDF15 no permiten esta diferenciación (ver ejemplo 2). Por lo tanto y en este sentido, la utilidad clínica de la determinación de GDF15 en orina, para apoyar o descartar la existencia de nefropatía diabética sería de gran interés, porque evitaría realizar la biopsia de tejido renal, un procedimiento altamente invasivo, en pacientes con alta sospecha clínica de nefropatía diabética y un GDF15 en orina alto. Por otro lado, una alta sospecha clínica de nefropatía diabética y un GDF15 en orina bajo, podría sugerir realizar biopsia renal para descartar otra causa de ERC que requiera un tratamiento diferente al del manejo general de la ERC, como por ejemplo un tratamiento inmunosupresor.

Así pues, la presente invención proporciona un método no invasivo para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal, fácilmente utilizable en la práctica clínica diaria, mediante un test sencillo, rápido y económico que permite la determinación en serie de un alto volumen de muestras.

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de al menos los niveles o concentración urinarios de la proteína GDF15, opcionalmente previa, posterior o simultáneamente a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria, preferiblemente posteriormente a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria, como marcador de diagnóstico y/o pronóstico de daño renal. Por daño renal en la presente invención nos referimos, sin limitarnos, a cualquier anormalidad funcional o estructural de diversa etiología ya sea por una disminución en la perfusión renal o intrarrenal, por una agresión tóxica u obstrucción del túbulo renal, por inflamación

tubulointersticial y edema o por una reducción en la capacidad de filtración del glomérulo. En una realización más preferida de la presente invención, el daño renal que se puede diagnosticar y/o pronosticar es un daño renal agudo o crónico, más preferiblemente el daño renal que se puede diagnosticar y/o pronosticar es un daño renal crónico (ERC).

Por daño renal agudo en la presente invención nos referimos a un daño renal cuya anormalidad funcional o estructural que lo produce está presente durante menos de tres meses consecutivos. Más de tres meses consecutivos de dicha anormalidad funcional o estructural produciría un daño renal crónico (Kidney Disease: Improving Global

Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease . Kidney International Supplements 2013;3: 1-150) .

Se hace notar que, de acuerdo a cualquiera de los aspectos de la presente invención, los niveles de GDF15 se pueden medir o determinar por si mismos o se pueden normalizar con respecto a los niveles urinarios de creatinina.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la presente invención se refiere al uso de al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15, opcionalmente dichos niveles o concentración urinarios de GDF15 se determinan previa, posterior o simultáneamente a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria, preferiblemente los niveles o concentración urinarios de GDF15 se determinan posteriormente a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria, como marcador de diagnóstico de nefropatía diabética. Preferiblemente, la presente invención se refiere al uso de al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15, opcionalmente dichos niveles o concentración urinarios de GDF15 se determinan previa, posterior o simultáneamente a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria, preferiblemente los niveles o concentración urinarios de GDF15 se determinan posteriormente a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria, como marcador de diagnóstico diferencial de la causa etiológica del daño renal en pacientes diabéticos. Más preferiblemente, la presente invención se refiere al uso de al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15, opcionalmente dichos niveles o concentración urinarios de GDF15 se determinan previa, posterior o simultáneamente a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria, preferiblemente los niveles o concentración urinarios de GDF15 se determinan posteriormente a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria, como marcador de diagnóstico diferencial de la causa etiológica del daño renal en pacientes diabéticos, diferenciando entre pacientes diabéticos con nefropatía diabética y sin nefropatía diabética, donde dichos pacientes

diabéticos preferiblemente habían sido previamente diagnosticados con ERC en base a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la presente invención se refiere al uso de al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15, opcionalmente dichos niveles o concentración urinarios de GDF15 se determinan previa, posterior o simultáneamente a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria, preferiblemente los niveles o concentración urinarios de GDF15 se determinan posteriormente a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria, como marcador pronóstico de mortalidad de aquellos enfermos o pacientes diagnosticados con daño renal, ya sea éste daño agudo o crónico. Preferiblemente, la presente invención se refiere al uso de al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15, opcionalmente dichos niveles o concentración urinarios de GDF15 se determinan previa, posterior o simultáneamente a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria, preferiblemente los niveles o concentración urinarios de GDF15 se determinan posteriormente a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria, como marcador pronóstico de mortalidad de aquellos enfermos diagnosticados con daño renal crónico. Más preferiblemente, la presente invención se refiere al uso de al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15, opcionalmente dichos niveles o concentración urinarios de GDF15 se determinan previa, posterior o simultáneamente a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria, preferiblemente los niveles o concentración urinarios de GDF15 se determinan posteriormente a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria, como marcador pronóstico de mortalidad de aquellos enfermos diagnosticados con daño renal crónico; donde por pronóstico de mortalidad se entiende la muerte del paciente en un periodo menor a 5 años, preferiblemente menor a 3 años, más preferiblemente menor a 30 a meses, desde la determinación de la concentración incrementada de GDF15 en la orina del paciente. Preferiblemente, dichos enfermos habían sido previamente diagnosticados con ERC en base a la determinación del filtrado glomerular y/o la albuminuria.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para la obtención de datos útiles en el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal que comprende determinar en una muestra aislada de orina los niveles o concentración urinarios de GDF15. En una realización particular, dicho nivel o concentración se determina mediante análisis fluorométrico o mediante cualquier tipo de inmunoensayo (incluyendo ELISA) o mediante espectrometría de masas. En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el método es para la obtención de datos útiles en el diagnóstico de nefropatía diabética. Preferiblemente, el método es para la obtención de datos útiles en el diagnóstico diferencial de la causa etiológica del daño renal en pacientes diabéticos. Más preferiblemente, el

método es para la obtención de datos útiles en el diagnóstico diferencial de la causa etiológica del daño renal en pacientes diabéticos, aportando datos que ayudan en la diferenciación entre pacientes diabéticos que padecen de ERC, preferiblemente dicho diagnóstico de ERC se hace en base al filtrado glomerular y/o la albuminuria, con nefropatía diabética y sin nefropatía diabética.

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, el método es para la obtención de datos útiles en el pronóstico de mortalidad de aquellos enfermos diagnosticados con daño renal, ya sea este daño agudo o crónico. Preferiblemente, el método es para la obtención de datos útiles en el pronóstico de mortalidad de aquellos enfermos diagnosticados con daño renal crónico. Más preferiblemente, el método es para la obtención de datos útiles en el pronóstico de mortalidad de aquellos enfermos diagnosticados con daño renal crónico, preferiblemente dicho diagnóstico de ERC se hace en base al filtrado glomerular y/o la albuminuria , donde por pronóstico de mortalidad se entiende la muerte del paciente en un periodo menor a 5 años, preferiblemente menor a 3 años, más preferiblemente menor a 30 a meses, desde la determinación de la concentración incrementada de GDF15 en la orina del paciente.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal que comprende analizar una muestra de orina obtenida de un paciente, determinar al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15, y comparar dicho nivel o concentración con un valor control, donde la alteración de dicho nivel o concentración, donde preferiblemente dicha alteración constituye un incremento con respecto al valor control, es indicativa de daño renal. En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, el método es para el diagnóstico de nefropatía diabética, donde se determina al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15, y se compara dicho nivel o concentración con un valor control, donde la alteración de dicho nivel o concentración, donde preferiblemente dicha alteración constituye un incremento con respecto al valor control, es indicativa de nefropatía diabética. Preferiblemente, el método es para el diagnóstico diferencial de nefropatía diabética en un paciente diabético diagnosticado con ERC, preferiblemente dicho diagnóstico de ERC se hace en base al filtrado glomerular y/o la albuminuria , donde se determina al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15, y se compara dicho nivel o concentración con un valor control, donde la alteración de dicho nivel concentración, donde preferiblemente dicha alteración constituye un incremento con respecto al valor control, es indicativa de que la causa etiológica del daño renal en dicho pacientes diabético es la nefropatía diabética.

En otra realización preferida del tercer aspecto de la invención, el método es para el pronóstico de mortalidad de aquellos enfermos diagnosticados con daño renal, ya sea éste daño agudo o crónico, que

comprende analizar una muestra de orina aislada obtenida del paciente, determinar al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15, y comparar dicho nivel o concentración con un valor control, donde la alteración de dicho nivel o concentración, donde preferiblemente dicha alteración constituye un incremento con respecto al valor control, es indicativo de un pronóstico de muerte del paciente en un periodo menor a 5 años, preferiblemente menor a 3 años, más preferiblemente menor a 30 a meses, desde la determinación de la concentración incrementada de GDF15 en la orina del paciente. Preferiblemente, el método es para el pronóstico de mortalidad de aquellos enfermos diagnosticados con daño renal crónico, donde preferiblemente dicho diagnóstico de ERC se hace en base al filtrado glomerular y/o la albuminuria.

Por otro lado, la caracterización del GDF15 urinario sirve no sólo para dilucidar el diagnóstico o pronóstico de la enfermedad renal, ayudar a identificar el mecanismo del daño renal, y/o indicar el sitio y la severidad del daño, sino que debe ayudar a monitorizar la respuesta al tratamiento, para cribar o seleccionar pacientes y para tratar aquellos pacientes conforme a la selección o cribado efectuado.

Por tanto, un cuarto aspecto de la invención se refiere a un método de monitorización de la respuesta al tratamiento de un paciente diagnosticado con daño renal y que esté actualmente sujeto a tratamiento, que comprende analizar una muestra de orina obtenida del paciente, determinar al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15 en dicha muestra, y comparar dicho nivel o concentración con el nivel o concentración de GDF15 en una muestra de orina obtenida en un momento anterior en el tiempo del mismo paciente, donde la alteración de dicho nivel o concentración de forma que dicha alteración constituya una reducción con respecto al valor anterior, es indicativa de una progresión favorable del paciente; y donde la alteración de dicho nivel o concentración de forma que dicha alteración constituya un incremento con respecto al valor anterior, es indicativa de una progresión desfavorable del paciente. En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, el paciente ha sido diagnosticado con ERC. En otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención el paciente es diabético diagnosticado con ERC y con nefropatía diabética.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un método de cribado de pacientes diabéticos que padecen o han sido diagnosticados con ERC, preferiblemente dicho diagnóstico de ERC se hace en base al FG y/o a la A, que comprende analizar una muestra de orina obtenida del paciente, determinar al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15, y comparar dicho nivel o concentración con un valor control, donde si existe una alteración de dicho nivel o concentración y dicha alteración constituye un incremento con respecto al valor control, el paciente se clasifica como un paciente diabetico que padece de nefropatía diabética; y donde si no existe una alteración de dicho nivel o concentración o si

dicha alteración constituye una reducción con respecto al valor control, el paciente se clasifica como un paciente diabético que padece de una ERC distinta a la nefropatía diabética. Aquellos pacientes que padezcan de una ERC distinta a la nefropatía diabética, normalmente serán objeto de una biopsia para determinar la causa de la ERC. Aquellos pacientes que padezcan de nefropatía diabética, no serán objeto de una biopsia al haberse determinado la causa de la ERC.

En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, al paciente que padece de diabetes ya sea ésta diabetes mellitus tipo I o II y se clasifica de acuerdo al quinto aspecto de la invención como un paciente que padece de nefropatía diabética, se le trata con al menos una composición farmacéutica seleccionada de las siguientes: estatinas, antiplaquetarios, inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2) tales como empagliflozina o canagliflozina, o con análogos del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) tales como el liraglutido. Preferiblemente si el paciente padece de diabetes mellitus tipo II y se clasifica de acuerdo al quinto aspecto de la invención como un paciente que padece de nefropatía diabética, se le trata con inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2) tales como empagliflozina o canagliflozina.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a un método de cribado de pacientes con alto riesgo de muerte y que padecen o han sido diagnosticados con enfermedad renal, preferiblemente de ERC y donde preferiblemente dicho diagnóstico de ERC se hace en base al filtrado glomerular y/o la albuminuria , que comprende analizar una muestra de orina aislada obtenida del paciente, determinar al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15, y comparar dicho nivel o concentración con un valor control, donde si existe una alteración de dicho nivel o concentración y dicha alteración constituye un incremento con respecto al valor control, el paciente se selecciona como un paciente con pronóstico de muerte en un periodo menor a 5 años, preferiblemente menor a 3 años, más preferiblemente menor a 30 a meses, desde la determinación de la concentración incrementada de GDF15 en la orina del paciente. Preferiblemente, el método es para el pronóstico de mortalidad de aquellos enfermos diagnosticados con daño renal crónico, donde preferiblemente dicho diagnóstico de ERC se hace en base al FG y/o a la A. En una realización preferida del sexto aspecto de la invención el paciente, diabético o no, que padece de enfermedad renal, preferiblemente de ERC y donde preferiblemente dicho diagnóstico de ERC se hace en base al FG y/o a la A, y se clasifica de acuerdo al sexto aspecto de la invención como un paciente con pronóstico de muerte en un periodo menor a 5 años, se le trata con al menos una composición farmacéutica seleccionada de las siguientes: estatinas, antiplaquetarios, inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2) tales como empagliflozina o canagliflozina, o con análogos del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) tales como el liraglutido..

En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal según cualquiera de los métodos descritos anteriormente, que comprende los reactivos necesarios para determinar el nivel o concentración de GDF15 en una muestra de orina tales como anticuerpos anti-GDF15, o fragmentos de los mismos o aptámeros anti-GDF15 o fluorocromos. En una realización preferida, el kit comprende los sustratos necesarios para determinar cuantitativamente la concentración o al nivel de GDF15 mediante un método fluorométrico o mediante cualquier tipo de inmunoensayo (tal y como un ELISA) utilizando anticuerpos anti-GDF15 o fragmentos de los mismos o aptámeros anti-GDF15. En un quinto aspecto, la presente invención se refiere al uso dicho kit para el diagnóstico y pronóstico del daño renal, preferiblemente para llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos en los aspectos segundo a sexto de la presente invención.

Los siguientes ejemplos meramente ilustran, pero en ningún caso limitan la presente invención.

Ejemplos

<u>Ejemplo 1. Curvas ROC GDF15 en sangre, suero y predicción de mortalidad</u>

Las curvas ROC mostradas en las figuras 4 y 5 justifican que GDF15 en orina es un biomarcador predictor de mortalidad significativamente mejor que en suero.

Los datos de la figura 4 ilustran el comportamiento de GDF15 en <u>orina</u> como predictor de mortalidad:

AUC: 0,952 (p<0,001)

Índice de Youden: 0,810

Punto de corte: 13,83 ng/mg

Sensibilidad: 1

1-Especificidad: 0,190

Los datos de la figura 5 ilustran el comportamiento de GDF15 en <u>suero</u> como predictor de mortalidad:

AUC: 0,896 (p<0,001)

Índice de Youden: 0,701

Punto de corte: 2,98 ng/ml

Sensibilidad: 0,889

1-Especificidad: 0,188

Ejemplo 2. Comparación entre determinar niveles urinarios de GDF15 en vez de niveles séricos de GDF15, para el diagnóstico de nefropatía diabética

Se analizaron los valores de GDF15 séricos y en orina, observando que los pacientes con valores de GDF15 más altos correspondían a pacientes con diagnóstico de nefropatía diabética, en sangre eran 2 veces más altos y en orina 3 veces más altos en pacientes con nefropatía diabética comparados con otros diagnósticos.

Sin embargo, comprobar si un paciente padece o no de nefropatía diabética resulta especialmente útil en pacientes diabéticos, para poder diferenciar la causa de la enfermedad renal crónica. Por eso se compararon los niveles de GDF15 urinario entre los pacientes diabéticos con nefropatía diabética y los pacientes diabéticos sin nefropatía diabética: los pacientes diabéticos con nefropatía diabética tuvieron niveles de GDF15 urinario 3 veces más altos y no se vio diferencia alguna con el GDF15 sérico (ver figura 2).

La utilidad clínica de la determinación de GDF15 en orina, para apoyar o descartar la existencia de nefropatía diabética sin realizar biopsia renal podría ser de gran interés, porque evitaría realizar la biopsia, un procedimiento invasivo, en pacientes con alta sospecha clínica de nefropatía diabética y un GDF15 en orina alto. Por otro lado, una alta sospecha clínica de nefropatía diabética y un GDF15 en orina bajo, podría sugerir realizar biopsia renal para descartar otra causa de ERC que requiera un tratamiento diferente al del manejo general de la ERC, como por ejemplo un tratamiento inmunosupresor.

En la figura 6 se ilustra la curva ROC de GDF15 en orina como biomarcador de nefropatía diabética en pacientes diabéticos: (N=13)

AUC: 0,900 (p=0,019)

Índice de Youden: 0,750

Punto de corte: 10,486 ng/mg

Sensibilidad: 1,000

1-Especificidad: 0,250

REIVINDICACIONES

1. Uso *in vitro* de al menos los niveles o concentración urinarios del factor 15 de crecimiento y diferenciación (GDF15), opcionalmente normalizados con respecto a los niveles o concentración urinarios de creatinina, como marcador de diagnóstico y/o pronóstico de daño renal.

2. El uso según la reivindicación anterior, donde los niveles o concentración urinarios de GDF15 se usan como marcador de daño renal crónico (ERC).

3. El uso según la reivindicación anterior, donde los niveles o concentración urinarios de GDF15 se usan como marcador de ERC causado por una nefropatía diabética.

4. Método para la obtención de datos útiles en el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal que comprende determinar en una muestra aislada de orina los niveles o concentración urinarios de GDF15.

5. El método según la reivindicación 4, donde el método es para la obtención de datos útiles en el diagnóstico diferencial de la causa etiológica del daño renal en pacientes diabéticos.

6. El método según la reivindicación 4, donde el método es para la obtención de datos útiles en el diagnóstico diferencial de la causa etiológica del daño renal en pacientes diabéticos, aportando datos que ayudan en la diferenciación entre pacientes diabéticos con nefropatía diabética y sin nefropatía diabética.

7. El método según la reivindicación 4, donde el método es para la obtención de datos útiles en el pronóstico de mortalidad de aquellos enfermos diagnosticados con daño renal crónico, donde por pronóstico de mortalidad se entiende la muerte del paciente en un periodo menor a 5 años, preferiblemente menor a 3 años, más preferiblemente menor a 30 a meses, desde la determinación de la concentración de GDF15 en la orina del paciente.

8. Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal que comprende a partir de una muestra aislada de orina obtenida de un paciente, determinar al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15, y comparar dicho nivel o concentración con un valor control

o umbral, donde la alteración de dicho nivel o concentración, donde preferiblemente dicha alteración constituye un incremento con respecto al valor control o umbral, es indicativa de daño renal.

9. El método según la reivindicación 8, donde el paciente es diabético, y donde la alteración de dicho nivel o concentración es indicativa de daño renal crónico causado por nefropatía diabética.

10. El método según la reivindicación 8, donde el método es para el pronóstico de mortalidad de aquellos enfermos diagnosticados con daño renal crónico, y donde dicho método comprende analizar una muestra de orina aislada obtenida del paciente, determinar al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15, y comparar dicho nivel o concentración con un valor control o umbral, donde la alteración de dicho nivel o concentración, donde preferiblemente dicha alteración constituye un incremento con respecto al valor control o umbral, es indicativo de un pronóstico de muerte del paciente en un periodo menor a 5 años, preferiblemente menor a 3 años, más preferiblemente menor a 30 a meses, desde la determinación de la concentración de GDF15 en la orina del paciente.

11. Método de monitorización de la respuesta al tratamiento de un paciente diagnosticado con daño renal crónico y que esté actualmente sujeto a tratamiento, que comprende a partir de una muestra aislada de orina obtenida del paciente, determinar al menos los niveles o concentración urinarios de GDF15 en dicha muestra, y comparar dicho nivel o concentración con el nivel o concentración de GDF15 en una muestra de orina obtenida en un momento anterior en el tiempo del mismo paciente, donde la alteración de dicho nivel o concentración, donde preferiblemente dicha alteración constituye una reducción con respecto al valor anterior, es indicativa de una progresión favorable del paciente.

12. Uso in vitro de un kit para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal según cualquiera de los métodos descritos en las reivindicaciones 4 a 10, donde dicho kit comprende anticuerpos anti-GDF15 o fragmentos de los mismos o aptámeros anti-GDF15, para determinar el nivel o concentración de GDF15 en una muestra de orina.

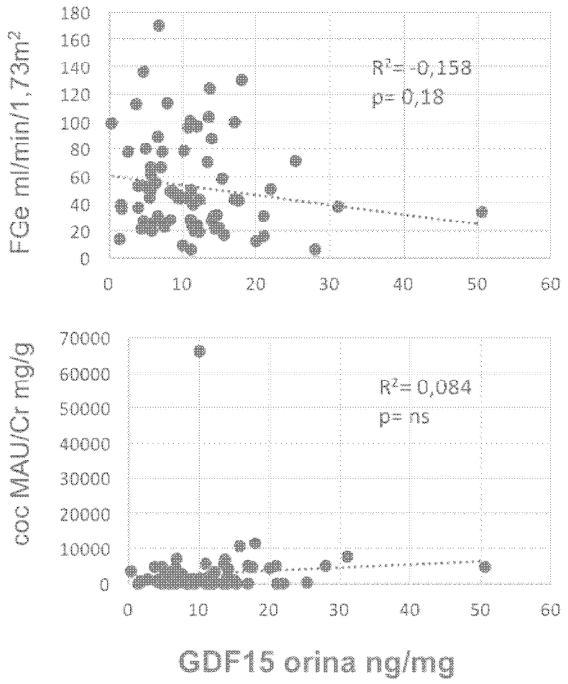

FGe ml/min/1,73m²
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
R²= -0,158
p= 0,18
coc MAU/Cr mg/g
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
R²= 0,084
p= ns
GDF15 orina ng/mg

Fig. 1

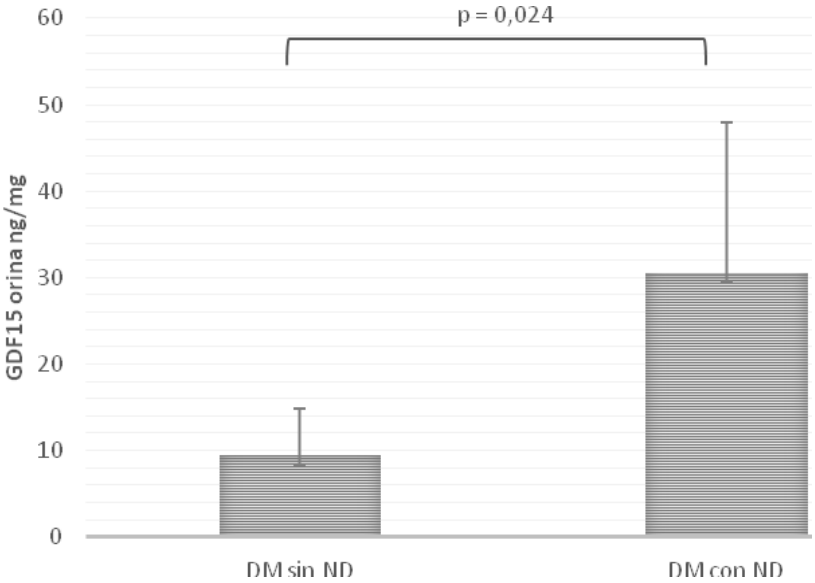

p = 0,024
GDF15 orina ng/mg
60
50
40
30
20
10
0
DM sin ND
DM con ND

Fig. 2

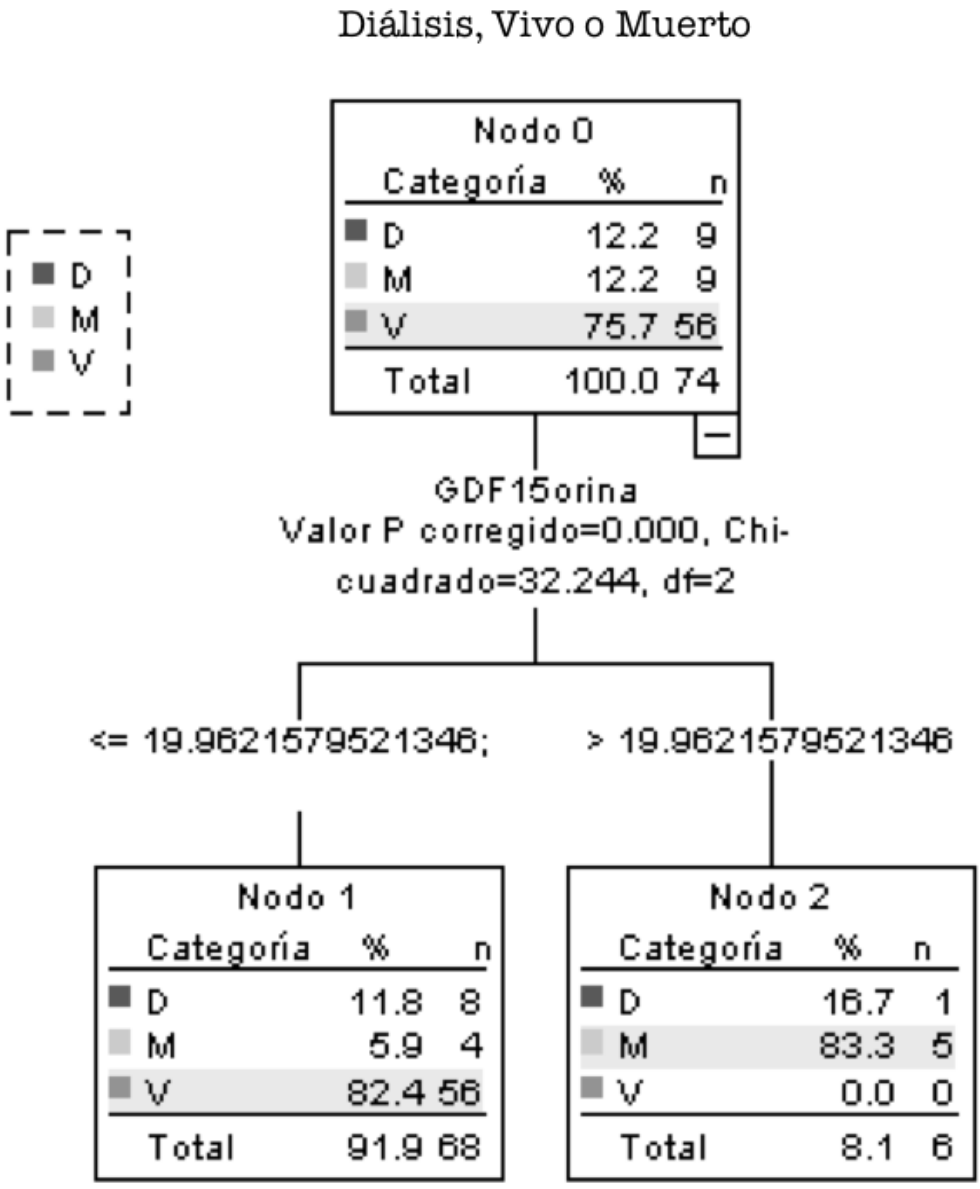
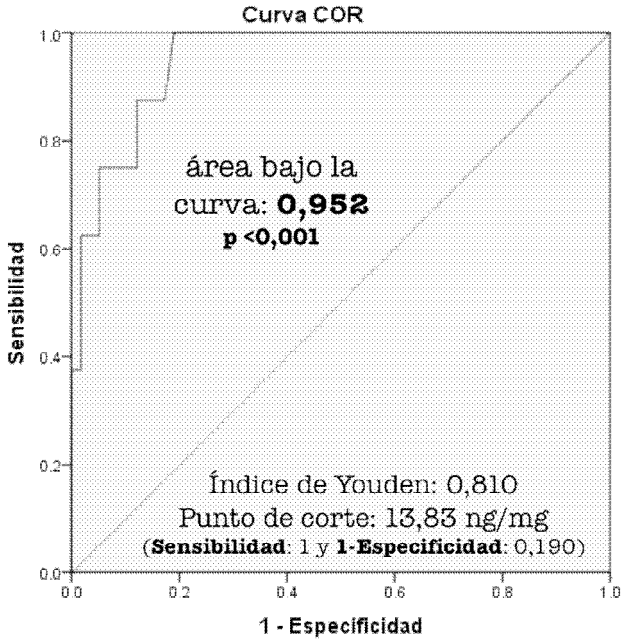

Diálisis, Vivo o Muerto
D
M
V
Nodo 0
Categoría % n
D 12.2 9
M 12.2 9
V 75.7 56
Total 100.0 74
GDF15orina
Valor P corregido=0.000, Chi-cuadrado=32.244, df=2
<= 19.96215795213346;
> 19.96215795213346
Nodo 1
Categoría % n
D 11.8 8
M 5.9 4
V 82.4 56
Total 91.9 68
Nodo 2
Categoría % n
D 16.7 1
M 83.3 5
V 0.0 0
Total 8.1 6

Fig. 3

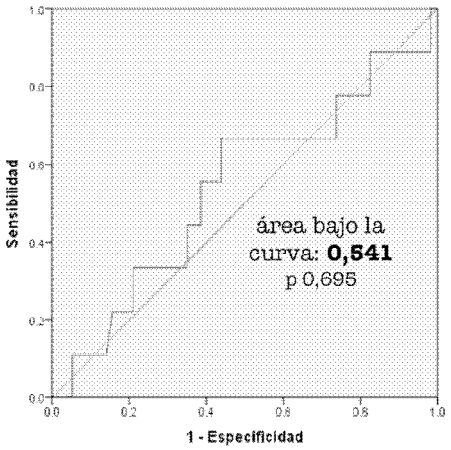
Curvas ROC

GDF15 orina, sensibilidad y especificidad para:

Mortalidad

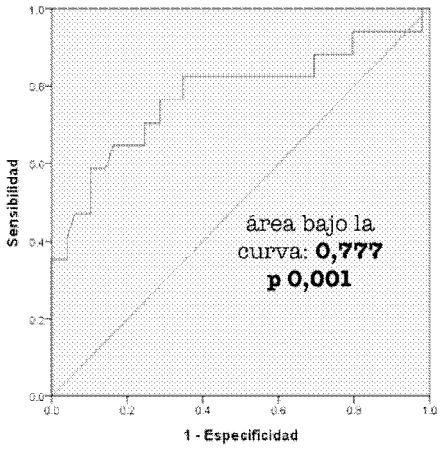


Diálisis



Índice de Youden: 0,228
Punto de corte: 11,14 ng/mg
(**Sensibilidad:** 0,661 y **1-Especificidad:** 0,439)

Muerte + Diálisis



Índice de Youden: 0,486
Punto de corte: 14,52 ng/mg
(**Sensibilidad:** 0,588 y **1-Especificidad:** 0,102)

Fig. 4

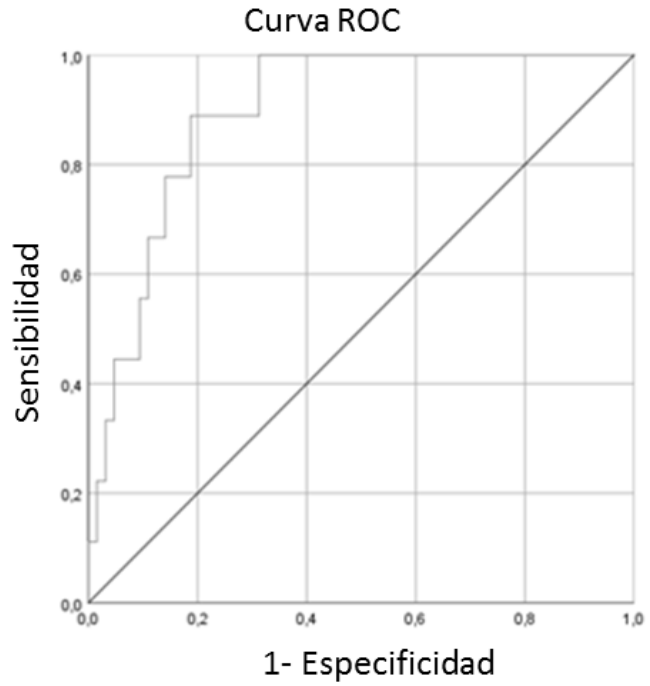

Curva ROC
Sensibilidad
1- Especificidad
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0

Fig. 5

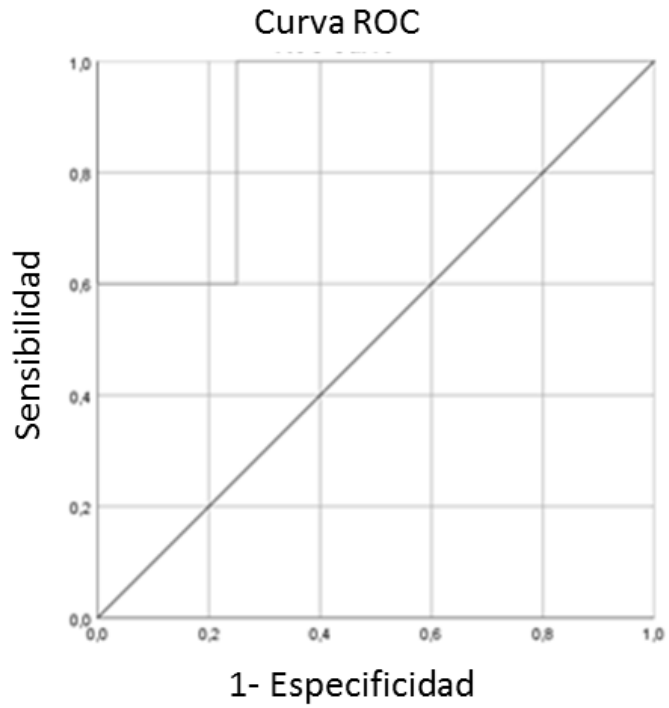

Curva ROC
Sensibilidad
1- Especificidad
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0

Fig. 6

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201830849

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 28.08.2018

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***G01N33/53*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	**(56) Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
X	US 2017328914 A1 (BROUEILH et al) 16/11/2017, todo el documento	2, 8, 10, 11
X	PAPASSOTIRIOU I. Is There any Clinical Value in determining GDF-15 during the Progression of Diabetic Nephropathy?. AACC Academy, 08/11/2016, todo el documento	2, 3, 8, 9, 11
X	SIMONSON M. S. et al. The renal transcriptome of *db/db* mice identifies putative urinary biomarker proteins in patients with type 2 diabetes: a pilot study. Am J Physiol Renal Physio, 28/12/2011, Vol. 302, Páginas F820-F829, todo el documento	2, 3, 8, 9, 11
A	HO J. E. et al. Biomarkers of Cardiovascular Stress and Incident Chronic Kidney Disease. Clinical Chemistry, 19/07/2013, Vol. 59, Nº 11, Páginas 1613-1620, todo el documento	2, 3, 8-11
A	HAMON S. M. et al. The clinical utility of Growth Differentiation Factor-15 (GDF-15) in patients diagnosed with Diabetic Kidney Disease (DKD). Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), 11/01/2018, Vol. 56, Nº 2, Páginas eA67, todo el documento	2, 3, 8-11
A	MAZAGOVA M. et al. Genetic deletion of growth differentiation factor 15 augments renal damage in both type 1 and type 2 models of diabetes. Am J Physiol Renal Physiol, 28/08/2013, Vol. 305, Páginas F1249-F1264, todo el documento	2, 3, 8-11

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☐ para todas las reivindicaciones

☒ para las reivindicaciones nº: 2, 3, 8-11

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
04.12.2018	M. Cumbreño Galindo	1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS