

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 008**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2014** **PCT/US2014/054278**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015** **WO15035155**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2014** **E 14842603 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019** **EP 3041576**

54 Título: **Métodos para detectar enfermedad renal**

30 Prioridad:

05.09.2013 US 201361874011 P

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

04.03.2020

73 Titular/es:

IDEXX LABORATORIES, INC. (100.0%)

One Idexx Drive

Westbrook, ME 04092, US

72 Inventor/es:

YERRAMILLI, MAHALAKSHMI y

YERRAMILLI, MURTHY, V.S.N.

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 746 008 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 para detectar enfermedad renal

5 **Campo**

La divulgación se refiere de manera general a la determinación de la función renal. Más particularmente, la divulgación se refiere a métodos para estimar la tasa de filtración glomerular y diagnosticar, pronosticar y determinar la progresión de enfermedad renal.

10

Técnica relacionada

Resulta importante poder medir la función renal de manera rápida y con precisión. Por ejemplo, la dosificación de fármacos debe adaptarse para pacientes con insuficiencia renal. Por tanto, realizar una evaluación precisa de la función renal es un requisito en la medicina clínica. Sin embargo, el diagnóstico de insuficiencia renal se ve dificultado por la falta de marcadores fiables de la tasa de filtración glomerular (GFR) y/o pruebas de diagnóstico disponibles. Una medida ampliamente usada de la GFR es el aclaramiento de inulina, pero esta prueba es complicada y cara, lo cual reduce esencialmente su utilidad en la práctica clínica. Esto también es cierto para pruebas de aclaramiento de radioisótopos. Por tanto, en la práctica clínica, normalmente se usa creatinina en suero para evaluar la función renal. Sin embargo, los usos de creatinina en suero pueden presentar imprecisión, ya que los datos pueden estar sujetos a un grado relativamente alto de variabilidad.

15

20

M.B. Nabity *et al.*, 9 de mayo de 2013, XP055350785, divulgan la correlación entre SDMA y la tasa de filtración glomerular (GFR) en perros con o sin enfermedad renal progresiva crónica.

25

Macallister *et al.*, Nephrol Dial Transplant, 1 de enero de 1996, 2449-2452, divulgan que un aumento significativo de la razón de SDMA/creatinina era evidente en muestras de plasma de pacientes antes y después de 4 horas de hemodiálisis. No se ha realizado ninguna correlación con la filtración glomerular. Además, no se correlaciona ningún producto de niveles de SDMA y creatinina.

30

Kielstein *et al.*, Nephrology Dialyses Transplantation, vol. 26, n.º 1, 9 de julio de 2010, págs. 324-328, divulgan múltiples estudios que implican la correlación de SDMA en suero y creatinina en suero con la tasa de filtración glomerular (GFR) estimada. No se han correlacionado los niveles de SDMA y creatinina.

35

M.B. Nabity *et al.*, J Vet Intern Med, vol. 29, n.º 4, 16 de junio de 2015, divulgan que los niveles en sangre de SDMA representan un marcador temprano para los cambios de GFR tras la donación de riñón de pariente vivo y por tanto que permite la detección de lesión renal aguda. Además, se midieron los niveles de creatinina en suero (figura 3). No se ha correlacionado ningún producto de niveles de SDMA y creatinina.

40

Por consiguiente, los inventores han identificado una necesidad en la técnica de métodos de evaluación de la función renal con precisión aumentada.

Sumario

45

La invención se refiere a un método para estimar la tasa de filtración glomerular (GFR) en un sujeto animal, tal como se define mediante las reivindicaciones adjuntas. El método incluye medir la concentración de SDMA libre en una muestra de sangre del sujeto, medir la concentración de creatinina en una muestra de sangre del sujeto; y comparar un valor resultante de una ecuación que comprende el producto de la concentración de creatinina y la concentración de SDMA libre con uno o más valores convencionales que se correlacionan con la tasa de filtración glomerular en el sujeto animal.

50

En diversas realizaciones a modo de ejemplo del método descrito en el presente documento, la ecuación comprende la inversa del producto de la concentración de creatinina y la concentración de SDMA libre. Además, la concentración de creatinina y/o la concentración de SDMA libre pueden ponderarse en el cálculo. La etapa de comparación puede realizarse usando un microprocesador. El método también incluye determinar la función renal, enfermedad renal o disfunción renal comparando la GFR en el sujeto con la GFR en uno o más sujetos sanos.

55

En otro aspecto de referencia, la divulgación se refiere a un método de diagnóstico de enfermedad renal o disfunción renal en un sujeto animal. El método incluye medir la concentración de SDMA libre en suero del sujeto; medir la concentración de creatinina en suero del sujeto; y comparar el producto de un primer valor ponderado basado en la concentración de creatinina y un segundo valor ponderado basado en la concentración SDMA libre con uno o más valores convencionales que se correlacionan con enfermedad renal o disfunción renal.

60

En realizaciones a modo de ejemplo particulares, el producto de un primer valor ponderado basado en la concentración de creatinina y un segundo valor ponderado basado en la concentración SDMA libre se representa mediante la fórmula $PROD = (CRE)^p \times (SDMA)^q$ en la que PROD es el producto, CRE es la concentración de

65

creatinina, SDMA es la concentración de SDMA, P proporciona el peso que va a darse a CRE en la fórmula, y Q proporciona el peso que va a darse a SDMA en la fórmula. El uno o más valores convencionales pueden correlacionarse con la inversa del producto.

Un aspecto de referencia adicional de la divulgación se refiere a un método para calcular un valor asociado con los diagnósticos de enfermedad renal o disfunción renal en un sujeto animal. El método incluye ejecutar instrucciones legibles por máquina para calcular el producto de un primer valor ponderado basado en la concentración de creatinina en una muestra de sangre del sujeto y un segundo valor ponderado basado en la concentración de SDMA libre en una muestra de sangre del sujeto.

En aún otro aspecto de referencia adicional, la divulgación se refiere a un método de determinación de si un individuo tiene enfermedad renal. El método incluye medir concentraciones de SDMA [SDMA] y creatinina [CRE] en una muestra de suero del individuo, calcular una razón de $[SDMA] / SDMA_{CORTE}$, calcular una razón de $[CRE] / CRE_{CORTE}$, calcular un valor de combinación: $C = [SDMA] / SDMA_{CORTE} + [CRE] / CRE_{CORTE}$, y determinar que el individuo tiene enfermedad renal si C es mayor que C_{CORTE} , en el que, $SDMA_{CORTE}$ es el valor de corte para SDMA, CRE_{CORTE} es el valor de corte para creatinina, y C_{CORTE} es el valor de corte para el valor de combinación.

Un método según la divulgación incluye determinar si un individuo tiene enfermedad renal. El método incluye medir concentraciones de SDMA [SDMA] y creatinina [CRE] en una muestra de suero del individuo, calcular una razón de $[SDMA] / SDMA_{CORTE}$, calcular una razón de $[CRE] / CRE_{CORTE}$, calcular un valor de combinación: $C = [SDMA] / SDMA_{CORTE} + [CRE] / CRE_{CORTE}$, y determinar que el individuo tiene enfermedad renal si C es mayor que C_{CORTE} , en el que $SDMA_{CORTE}$ es el valor de corte para SDMA, CRE_{CORTE} es el valor de corte para CRE y C_{CORTE} es el valor de corte para el valor de combinación.

Todavía adicionalmente, la divulgación se refiere en un aspecto de referencia a un método para predecir la muerte temprana en un sujeto animal, el método incluye medir la concentración de SDMA libre en suero del sujeto, medir la concentración de creatinina en suero del sujeto, calcular una razón de $[SDMA]/[CRE]$, y determinar que el individuo padecerá muerte temprana si la razón es superior a un valor de corte.

En una realización, la divulgación se refiere en un aspecto de referencia a un método para la determinación de mortalidad asociada con enfermedad renal. El método incluye medir SDMA libre en una muestra de sangre de un paciente, por ejemplo un animal canino o felino, y determinar que el paciente tiene una probabilidad aumentada de muerte asociada con enfermedad renal cuando el paciente tiene una concentración en sangre de SDMA mayor que un nivel de umbral. El método puede incluir además la etapa de medir creatinina en la muestra de sangre, calcular la razón de $[SDMA]/[CRE]$, en el que el que el paciente tiene una probabilidad aumentada de muerte asociada con enfermedad renal cuando el paciente tiene una razón en sangre de $[SDMA]/[CRE]$ mayor que una razón de umbral.

En otro aspecto, la divulgación también se refiere en un aspecto de referencia a un dispositivo para determinar la función renal en un sujeto animal. El dispositivo incluye una primera fase sólida que tiene unido a la misma un análogo de SDMA, o un anticuerpo específico para SDMA que no tiene ninguna o sustancialmente ninguna reactividad cruzada con uno o más compuestos seleccionados de dimetilarginina asimétrica (ADMA), L-arginina y N-metilarginina; y una segunda fase sólida que tiene unido a la misma un reactivo de detección de creatinina o un anticuerpo específico para creatinina.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere en un aspecto de referencia a un kit para la determinación de la función renal en un sujeto animal. El kit incluye uno o más reactivos de detección de creatinina y uno o más reactivos de detección de SDMA, y opcionalmente incluye un conjunto de uno o más valores convencionales asociados con la función renal basados en el producto de la concentración de creatinina y la concentración de SDMA en una o más muestras de sangre de los animales.

Todavía adicionalmente, la divulgación se refiere en un aspecto de referencia a un dispositivo de cálculo que tiene un almacenamiento de memoria que comprende instrucciones de software que, cuando se ejecutan, calculan la inversa del producto de la concentración de creatinina y la concentración de SDMA libre. El almacenamiento de memoria también puede incluir instrucciones de software para comparar el resultado del cálculo con uno o más valores convencionales que representan la tasa de filtración glomerular en un sujeto animal.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos adjuntos, que se incluyen para proporcionar una comprensión adicional de la divulgación, se incorporan en, y constituyen parte de, esta memoria descriptiva, ilustran realizaciones de la divulgación y junto con la descripción detallada sirven para explicar los principios de la invención. No se realiza ningún intento por mostrar detalles estructurales de la invención en más detalle de lo que pueda ser necesario para una comprensión fundamental de la invención y diversas maneras en las que puede ponerse en práctica.

La figura 1 es un gráfico que compara los resultados de un método de ELISA de detección de SDMA con espectrometría de masas.

- La figura 2 es una representación gráfica de concentraciones de SDMA en perros sanos y perros que tienen cáncer, enfermedad cardíaca o enfermedad cardiorenal. La barra horizontal representa el valor de corte (determinado como concentración de SDMA media más 2 desviaciones estándar a partir de una población de perros sanos).
- La figura 3 es una representación gráfica de concentraciones de SDMA en gatos sanos y gatos que tienen enfermedad renal o cáncer. La barra horizontal representa el valor de corte (determinado como concentración de SDMA media más 2 desviaciones estándar a partir de una población de gatos sanos).
- La figura 4 es una representación gráfica de la absorbancia a 280 nm frente al número de fracción para la elución de un conjugado con proteína de SDMA-cistamida, en el que la proteína es KLH (♦) o BSA (■), a partir de una columna de filtración en gel Sephadex G-25M tal como se describe en los ejemplos.
- La figura 5 es una representación gráfica de la concentración de creatinina frente a GFR para un conjunto de muestras de suero canino, tal como se describe en el ejemplo 6.
- La figura 6 es una representación gráfica de la concentración de SDMA frente a GFR para un conjunto de muestras de suero canino, tal como se describe en el ejemplo 6.
- La figura 7 es una representación gráfica de $[Creatinina] \times [SDMA]$ frente a GFR para un conjunto de muestras de suero canino, tal como se describe en el ejemplo 6.
- La figura 8 muestra representaciones gráficas, usando un ajuste lineal, de creatinina frente a GFR, $1/SDMA$ frente a CGF y $1/[Creatinina^{0,37}] \times 1/[SDMA^{0,43}]$ frente a creatinina para un conjunto de muestras de suero canino, tal como se describe en el ejemplo 6.
- La figura 9 es una representación gráfica de la concentración de SDMA frente a GFR para un conjunto de muestras de suero felino, tal como se describe en el ejemplo 7.
- La figura 10 es una representación gráfica de la concentración de creatinina frente a GFR para un conjunto de muestras de suero felino, tal como se describe en el ejemplo 7.
- La figura 11 es una representación gráfica de $[Creatinina] \times [SDMA]$ frente a GFR para un conjunto de muestras de suero felino, tal como se describe en el ejemplo 7.
- La figura 12 muestra representaciones gráficas, usando un ajuste lineal, de $[Creatinina]$ frente a GFR, $1/SDMA$ frente a CGF, y $1/[Creatinina^{1,2}] \times 1/[SDMA^{0,39}]$ frente a creatinina para un conjunto de muestras de suero canino, tal como se describe en el ejemplo 7.
- La figura 13 es un gráfico que muestra la especificidad y sensibilidad mejoradas en un método para determinar enfermedad renal.
- La figura 14 muestra la correlación entre SDMA ($\mu\text{g/dl}$) y creatinina (mg/dl) en perros.
- La figura 15 muestra la concentración en suero de creatinina y SDMA en una población de gatos.
- La figura 16 muestra la concentración en suero de creatinina y SDMA en un gato a lo largo de un periodo de varios años.
- La figura 17 muestra la concentración en suero de creatinina y SDMA en un gato a lo largo de un periodo de varios años.
- La figura 18 muestra concentración en suero de creatinina y SDMA en un gato a lo largo de un periodo de varios años.
- La figura 19 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra que gatos que tienen una concentración de SDMA en suero de menos de $14 \mu\text{g/dl}$ sobreviven aproximadamente 1,6 veces más tiempo que gatos con concentraciones de más de $14 \mu\text{g/dl}$.
- La figura 20 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra que perros que tienen una concentración de SDMA en suero de menos de $14 \mu\text{g/dl}$ sobreviven aproximadamente 2,6 veces más tiempo que perros con concentraciones de más de $14 \mu\text{g/dl}$.

Descripción

En sus diversos aspectos, la divulgación se refiere a la determinación, diagnóstico, progresión y pronóstico de enfermedad renal y mortalidad asociada con enfermedad renal. La divulgación incluye un método para determinar la función renal, en particular estimando la tasa de filtración glomerular (GFR), en un animal. GFR puede ser útil en el diagnóstico y tratamiento de disfunción o enfermedad renal. La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

En diversos aspectos, la divulgación se refiere al uso de dimetilarginina simétrica libre (SDMA) y creatinina en muestras de sangre de animales, en particular gatos y perros, para determinar la tasa de filtración glomerular y enfermedad renal. En un aspecto, el producto de las concentraciones de creatinina y SDMA libre en muestras de sangre de un animal puede correlacionarse con la GFR y enfermedad renal. Por ejemplo, se usa la inversa del producto de las concentraciones de creatinina y SDMA libre (por ejemplo, $1/[\text{creatinina}][\text{SDMA}]$) y da inesperadamente como resultado una precisión mucho mayor para la medición de la tasa de filtración glomerular que el uso de cualquiera de las medidas solas. Por tanto, la divulgación incluye un método para medir la concentración de SDMA libre en una muestra de sangre del sujeto animal; medir la concentración de creatinina en una muestra de sangre del sujeto animal; y determinar la tasa de filtración glomerular del sujeto animal comparando la inversa del producto de la concentración de creatinina y la concentración de SDMA libre con uno o más valores convencionales para la tasa de filtración glomerular en el sujeto animal. Otros aspectos de la divulgación incluyen el uso de la concentración de SDMA sola o en una razón de la concentración de SDMA con respecto a la concentración de creatinina para la determinación de la enfermedad renal tal como se describe en el presente documento.

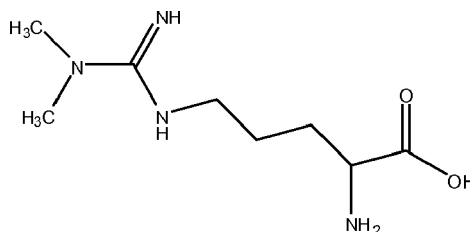
SDMA es el isómero estructural del inhibidor de óxido nítrico sintetasa (NOS) endógeno, dimetilarginina asimétrica (ADMA). Tanto ADMA y SDMA derivan de la metilación intranuclear de residuos de L-arginina y se liberan en el citoplasma tras la proteólisis. SDMA se produce mediante proteína-arginina metiltransferasa 5 (PRMT 5) y PRMT 7. Las proteínas que portan metilargininas, tales como SDMA, monometilarginina y ADMA, desempeñan un papel en el procesamiento de ARN, transporte de proteínas y transducción de señales (Bedford y Richard, Mol. Cell, 2005, 29 de abril, 18 (3): 263-72). La SDMA libre resultante de la degradación de tales proteínas metiladas se elimina principalmente mediante excreción renal, mientras que ADMA se metaboliza en gran medida. ADMA se correlaciona fuertemente con factores de riesgo de arteriopatía coronaria (CAD) tales como hipertensión, hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia, resistencia a la insulina, edad y tensión arterial media. SDMA se correlaciona con parámetros de la función renal, tales como tasa de filtración glomerular (GFR), aclaramiento de inulina y aclaramiento de creatinina.

Por consiguiente, un aspecto de la divulgación se refiere a un método para estimar la tasa de filtración glomerular de un sujeto animal usando los valores tanto para la concentración de SDMA libre como para la concentración de creatinina en suero. La inversa del producto de los valores (por ejemplo, $1/([\text{creatinina}][\text{SDMA}])$) se correlaciona de manera lineal con GFR de manera más precisa que la concentración de creatinina o SDMA solas.

A continuación se definen varios términos:

Ac es anticuerpo.

ADMA es dimetilarginina asimétrica. La estructura de ADMA es:



BUN es nitrógeno ureico en sangre.

BSA es albúmina de suero bovino.

CMIA es inmunoensayo magnético quimioluminiscente.

DCM es diclorometano.

DIPEA es N,N-diisopropiletilamina.

DMF es dimetilformamida.

EIA es inmunoensayo enzimático.

ELISA es ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

5

ESI-MS es ionización por electropulverización con espectrometría de masas.

FPIA es inmunoensayo de polarización con fluorescencia.

10

GFR es tasa de filtración glomerular.

HATU es metanamio de hexafluorofosfato de (1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-urano.

KLH es hemocianina de lapa californiana.

15

MEIA es inmunoensayo enzimático de micropartículas.

NOS es óxido nítrico sintasa.

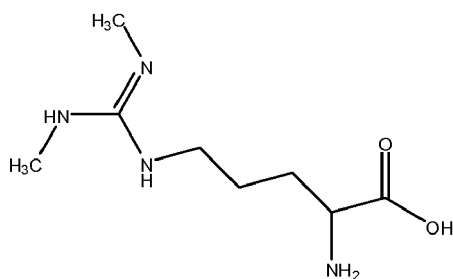
20

PBS es solución salina tamponada con fosfato.

RIA es radioinmunoensayo.

SDMA es dimetilarginina simétrica. La estructura de SDMA es:

25



SDMA libre se refiere a SDMA que no forma parte de una cadena de polipéptido. Uno o más residuos de aminoácido de SDMA pueden estar presentes en un polipéptido.

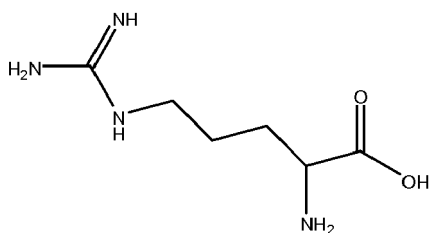
30

SLE es lupus eritematoso sistémico.

TFA es ácido trifluoroacético.

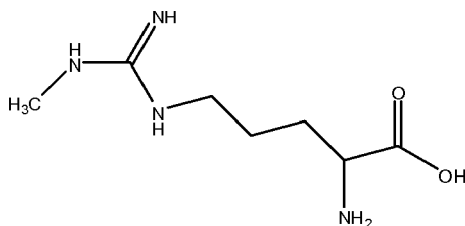
35

La estructura de arginina es:



N-MMA es N-monometilarginina, o simplemente N-metilarginina. La estructura de N-monometilarginina es:

40



El término “análogo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a un compuesto en el

que uno o más átomos individuales se han sustituido por un(os) átomo(s) diferente(s) o por un(os) grupo(s) funcional(es) diferente(s). Por ejemplo, un análogo puede ser una forma modificada del analito que puede competir con el analito por un receptor, proporcionando la modificación unos medios para unir el analito a otro resto, tal como un marcador o soporte sólido. El análogo de analito puede unirse a un anticuerpo de una manera similar al analito.

El término “anticuerpo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a una glicoproteína producida mediante células de linfocitos B en respuesta a la exposición a un antígeno y se une específicamente a ese antígeno. El término “anticuerpo” se usa en su sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad biológica deseada.

Tal como se usa en el presente documento, un “anticuerpo anti-SDMA”, “porción de anticuerpo anti-SDMA” o “fragmento de anticuerpo anti-SDMA” y/o “variante de anticuerpo anti-SDMA” y similares incluyen cualquier molécula que contiene proteína o péptido que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, tal como, pero sin limitarse a, una región determinante de la complementariedad (CDR) de una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región de entramado, o cualquier porción de las mismas.

El término “fragmento de anticuerpo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente el dominio variable o de unión a antígeno del mismo. Específicamente, por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden incluir fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término “antígeno”, tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a una sustancia que es capaz, en condiciones apropiadas, de reaccionar con un anticuerpo específico para el antígeno.

El término “analito”, tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a la sustancia, o conjunto de sustancias, en una muestra que se detectan y/o se miden.

El término “animal”, tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a cualquier animal, por ejemplo, un humano, o un animal no humano tal como un gato, un perro o un caballo.

El término “muestra de sangre”, tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a cualquier muestra líquida derivada de sangre, incluyendo, pero sin limitarse a, sangre completa, plasma y suero. Para proporcionar suero para su uso en los métodos de la divulgación, se obtienen una o más muestras de suero del sujeto animal. Las muestras de suero pueden obtenerse, por ejemplo, del sujeto animal como muestras de sangre, después separarse para proporcionar suero. En determinadas realizaciones, el suero puede medirse sin separación de la sangre. Tal como apreciará el experto en la técnica, una muestra obtenida individual puede dividirse o usarse de otro modo para realizar ambas mediciones de concentración. Alternativamente, puede obtenerse una pluralidad de muestras del sujeto animal, midiéndose (al menos) una muestra para determinar la concentración de creatinina, y midiéndose (al menos) una muestra para determinar la concentración de SDMA libre. En determinados de tales casos, las muestras se obtienen a partir del animal aproximadamente al mismo tiempo (por ejemplo, dentro del plazo de 60 minutos, dentro del plazo de 30 minutos o incluso dentro del plazo de 10 minutos unas de otras).

El término “reactividad cruzada”, tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a la capacidad de un sitio de unión a antígeno individual de un anticuerpo para reaccionar con más de un determinante antigénico o a la capacidad de una población de moléculas de anticuerpo para reaccionar con más de un antígeno. En general, surgen reacciones cruzadas porque (i) el antígeno de reacción cruzada comparte un epítipo en común con el antígeno de inmunización o (ii) tiene un epítipo que es estructuralmente similar a uno en el antígeno de inmunización (multiespecificidad).

El término “inmunoensayo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a una prueba que emplea complejos de anticuerpo y antígeno para generar una respuesta medible. Un “complejo de anticuerpo:antígeno” puede usarse de manera intercambiable con el término “inmunocomplejo”. Los inmunoensayos incluyen, en general, inmunoensayos no competitivos, inmunoensayos competitivos, inmunoensayos homogéneos e inmunoensayos heterogéneos. En “inmunoensayos competitivos”, se mide analito sin marcar (o antígeno) en la muestra de prueba mediante su capacidad para competir con antígeno marcado en el inmunoensayo. El antígeno sin marcar bloquea la capacidad del antígeno marcado para unirse porque el sitio de unión en el anticuerpo ya está ocupado. En “inmunoensayos competitivos”, la cantidad de antígeno presente en la muestra de prueba está inversamente relacionada con la cantidad de señal generada a partir del marcador. A la inversa, en “inmunoensayos no competitivos”, también conocidos como inmunoensayos de tipo “sándwich”, el analito se une entre dos reactivos de anticuerpo altamente específicos para formar un complejo y la cantidad de antígeno es directamente proporcional a la cantidad de señal asociada con el complejo. Los inmunoensayos que requieren la separación de complejos de anticuerpo:antígeno unidos se denominan generalmente “inmunoensayos heterogéneos”, y los inmunoensayos que no requieren separación de complejos de anticuerpo:antígeno se denominan generalmente “inmunoensayos

homogéneos". Un experto en la técnica entenderá fácilmente los diversos formatos de inmunoensayo.

El término "complejos inmunitarios", tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a los complejos formados por la unión de moléculas de antígeno y anticuerpo, con o sin fijación de complemento. Cuando uno de cualquiera del anticuerpo o el antígeno está marcado, el marcador se asocia con el complejo inmunitario como resultado de la unión entre el antígeno y el anticuerpo. Por tanto, cuando el anticuerpo está marcado, el marcador llega a asociarse con el antígeno como resultado de la unión. De manera similar, cuando el antígeno está marcado (por ejemplo, un análogo de analito que tiene un marcador), el marcador llega a asociarse con el anticuerpo como resultado de la unión entre el antígeno y el anticuerpo.

El término "marcador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto, composición o soporte sólido detectable, que puede conjugarse directa o indirectamente (por ejemplo, por medios covalentes o no covalentes, solos o encapsulados) con un anticuerpo, análogo de SDMA o antígeno de la divulgación. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos, colorante quimioluminiscente, marcadores electroquímicos, quelatos de metales, partículas de látex o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, pueden catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable (por ejemplo, enzimas tales como peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina y similares). El marcador empleado en la presente divulgación puede ser, pero no se limita a: fosfatasa alcalina; glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH"); peroxidasa del rábano (HRP); agentes quimioluminiscentes tales como isoluminol, agentes que fluorescen tales como fluoresceína y compuestos de rodamina; ribozimas; y colorantes. El marcador también puede ser una molécula de unión específica que puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, biotina, avidina, estreptavidina, digoxigenina, maltosa, oligohistidina, 2,4-dinitrobenzoceno, fenilarseniato, ADNcs, ADNcd y similares). El marcador puede unirse a otra molécula o soporte sólido y que se elige por características específicas que permiten la detección de la molécula marcada. El uso de un marcador produce una señal que puede detectarse por medios tales como detección de radiación electromagnética o visualización directa, y que pueden medirse opcionalmente.

El término "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento se refiere de manera general a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. A diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único epítipo en el antígeno. El modificador "monoclonal" simplemente se refiere al carácter del anticuerpo y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Específicamente, por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales mediante metodologías de hibridoma, o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante, o pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos de fago usando técnicas conocidas.

El término "polipéptido", tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a una molécula que tiene una secuencia de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Este término incluye proteínas, proteínas de fusión, oligopéptidos, péptidos cíclicos y derivados de polipéptidos. Los anticuerpos y derivados de anticuerpos se comentaron anteriormente en una sección independiente, pero los anticuerpos y derivados de anticuerpos se tratan, para los propósitos de la divulgación, como una subclase de los polipéptidos y derivados de polipéptidos.

El término "soporte sólido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una matriz no acuosa a la que puede adherirse el anticuerpo o análogo de SDMA de la presente divulgación. Los ejemplos de soporte sólido incluyen soportes formados parcial o totalmente por vidrio (por ejemplo, vidrio de poros controlados), polímeros sintéticos y naturales, polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poli(acrilamidas, poliestireno, poli(alcoholes vinílicos) y siliconas, partículas magnéticas, partículas de látex, tiras de cromatografía, placas de poliestireno de microtitulación, o cualquier otra sustancia que permita lavar o separar antígenos y/o anticuerpos unidos de materiales no unidos. En determinadas realizaciones, dependiendo de la aplicación, el soporte sólido puede ser el pocillo de una placa de ensayo o puede ser una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía por afinidad).

"Receptor" se refiere a cualquier compuesto o composición capaz de reconocer una organización espacial y polar particular de una molécula, por ejemplo, sitio epitópico o determinante. Los receptores ilustrativos incluyen anticuerpos, fragmentos Fab y similares.

"Especificidad de unión" o "unión específica" se refieren al reconocimiento sustancial de una primera molécula por una segunda molécula, por ejemplo un polipéptido y un anticuerpo policlonal o monoclonal, o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo un fragmento Fv, Fv de cadena sencilla, Fab' o F(ab')₂) específico para el polipéptido. Por ejemplo, "especificidad", tal como se usa en el presente documento, se refiere de manera general a la capacidad de un sitio de combinación de anticuerpo individual para reaccionar únicamente con un determinante antigénico o la capacidad de una población de moléculas de anticuerpo para reaccionar únicamente con un antígeno. En general, existe un alto grado de especificidad en las reacciones antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos pueden distinguir diferencias en (i) la estructura primaria de un antígeno, (ii) formas isoméricas de un antígeno, y (iii) la estructura

secundaria y terciaria de un antígeno. Las reacciones anticuerpo-antígeno que muestran alta especificidad muestran baja reactividad cruzada.

“Unión sustancial” o “unirse sustancialmente” se refieren a una cantidad de reconocimiento o unión específica entre moléculas en una mezcla de ensayo en condiciones de ensayo particulares. En su aspecto más amplio, unión sustancial se refiere a la diferencia entre la incapacidad de una primera molécula de unirse a, o reconocer, una segunda molécula, y la capacidad de la primera molécula de unirse a, o reconocer, una tercera molécula, de tal manera que la diferencia es suficiente como para permitir llevar a cabo un ensayo significativo distinguiendo la unión específica en un conjunto particular de condiciones de ensayo, que incluyen las concentraciones relativas de las moléculas, y el tiempo y temperatura de una incubación. En otro aspecto, una molécula es sustancialmente incapaz de unirse a, o reconocer, otra molécula en un sentido de reactividad cruzada en el que la primera molécula muestra una reactividad por una segunda molécula que es de menos del 25%, menos del 10%, menos del 5% o menos del 1% de la reactividad mostrada hacia una tercera molécula en un conjunto particular de condiciones de ensayo. La unión específica puede someterse a prueba usando varios métodos ampliamente conocidos, por ejemplo, un ensayo inmunohistoquímico, un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western.

El término “sal”, tal como se usa en el presente documento, significa una sal formada entre un ácido y un grupo funcional básico de un compuesto. Las sales ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). El término “sal” también se refiere a una sal formada entre un compuesto que tiene un grupo funcional ácido, tal como un grupo funcional ácido carboxílico, y una base orgánica o inorgánica. Las bases adecuadas incluyen, pero no se limitan a, hidróxidos de metales alcalinos tales como sodio, potasio y litio; hidróxidos de metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio; hidróxidos de otros metales, tales como aluminio y cinc; amoniaco, y aminas orgánicas, tales como mono, di o trialkilaminas no sustituidas o sustituidas con hidroxilo; dicitclohexilamina; tributilamina; piridina; N-metil-N-etilamina; dietilamina; trietilamina; mono, bis o tris-(2-hidroxi-alkil inferior-aminas), tales como mono, bis o tris-(2-hidroxi)etilamina, 2-hidroxi-terc-butilamina o tris-(hidroximetil)metilamina, N,N-di-alkil inferior-N-(hidroxil-alkil inferior)-aminas, tales como N,N-dimetil-N-(2-hidroxi)etilamina o tri-(2-hidroxi)etilamina; N-metil-D-glucamina; y aminoácidos tales como arginina, lisina y similares.

En determinados métodos descritos en el presente documento, la tasa de filtración glomerular del sujeto animal se determina comparando los resultados de una ecuación que considera el producto de la concentración de creatinina y la concentración de SDMA libre en muestras de sangre de un sujeto animal. Por ejemplo, para determinar la GFR, puede compararse la inversa del producto de la concentración de creatinina y la concentración de SDMA libre con uno o más valores convencionales que se correlacionan con la tasa de filtración glomerular en el sujeto animal. Tal como se describe en más detalle en el ejemplo 6, a continuación, existe una relación lineal entre la GFR y la inversa del producto de la concentración de creatinina y la concentración de SDMA libre. Por consiguiente, el experto en la técnica puede establecer una ecuación lineal entre la GFR y $1/([creatinina][SDMA])$ para el sujeto animal (por ejemplo, usando a otros animales de la misma especie o tipo), y usar esa ecuación para proporcionar los valores convencionales para la comparación con la inversa del producto de las concentraciones medidas. Tal como apreciará el experto en la técnica, la comparación con valores convencionales puede incluir simplemente usar la ecuación para calcular la GFR a partir del valor de $1/([creatinina][SDMA])$. Alternativamente, puede determinarse un conjunto de valores convencionales de la inversa del producto de las concentraciones de creatinina y SDMA libre para un conjunto de valores de GFR conocidos; y puede determinarse la GFR del sujeto animal comparando la inversa del producto de sus concentraciones medidas de concentración de creatinina y SDMA libre con los valores convencionales. En determinadas realizaciones, la etapa de determinación se realiza usando un microprocesador programado para comparar la inversa del producto de las concentraciones de creatinina y SDMA libre con la ecuación o con el uno o más valores convencionales. El microprocesador es habitualmente un componente de un dispositivo de cálculo que contiene un almacenamiento de memoria que contiene instrucciones de software que, cuando se ejecutan, llevan a cabo la función de calcular la ecuación y realizar la comparación basándose en la introducción de un operario o un dispositivo de detección.

Tal como apreciará el experto en la técnica, la comparación de la inversa del producto de la concentración de creatinina y la concentración de SDMA libre con uno o más valores convencionales para la inversa del producto que se correlacionan con la tasa de filtración glomerular también incluye comparaciones numéricas que son matemáticamente equivalentes a tal comparación. Por ejemplo, también se contemplan comparaciones usando valores que son representativos de $\{constante \times (1/([creatinina][SDMA)])\}$ y/o $[constante \times GFR]$. Por ejemplo, la comparación puede lograrse basándose en el producto solo $([creatinina][SDMA])$. Además, un experto en la técnica apreciará que insertar un factor en el denominador y/o numerador del cociente $(1/([creatinina][SDMA]))$ no cambiará la intensidad de su relación con GFR (por ejemplo, $2/([SDMA][creatinina])$, $1/(2[SDMA][creatinina])$ o $5/(3[SDMA][creatinina])$). De manera similar, también se contempla la relación de $([creatinina][SDMA])$ con $1/GFR$.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a estimar la GFR usando la fórmula:

$$GFR \cong 1/(CRE \times SDMA).$$

- 5 Basándose en resultados experimentales, esta fórmula tiene un coeficiente de correlación (R al cuadrado) de aproximadamente 0,8347. Cuando se generaliza la ecuación de la siguiente manera:

$$GFR \cong (CRE)^P \times (SDMA)^Q$$

- 10 los exponentes (P y Q) que maximizan el coeficiente de correlación son $P \cong -1,551102$ y $Q \cong -0,2204409$. La R al cuadrado para este conjunto de exponentes es de 0,9116. Tal como entiende un experto en la técnica, P y Q son factores de ponderación que pueden ajustarse para maximizar el coeficiente de correlación.

- 15 Cambiar ligeramente los exponentes no parece afectar a la R al cuadrado de una manera significativa. Por ejemplo, cuando $P = -1,5$ y $Q = -0,25$, la R al cuadrado es de 0,9114. Por simplicidad, una transformación de potencia ideal para los niveles de creatinina y SDMA en relación con el nivel de GFR adopta la forma:

$$GFR \cong (CRE)^{-1.5} \times (SDMA)^{-0.25}$$

- 20 En diversas realizaciones, los factores de ponderación P y Q pueden ajustarse adicionalmente. Por ejemplo, P puede variar desde aproximadamente -5 hasta menos de casi 0 (por ejemplo, -0,01). Dicho de otro modo, P puede variar desde aproximadamente -5 hasta cualquier valor entre -5 y 0, pero sin incluir cero. En ejemplos no limitativos específicos, P puede variar desde aproximadamente -4,0 hasta -0,1, de aproximadamente -3,0 a -0,5, de aproximadamente -2,0 a -1,0, y de aproximadamente -1,0 a 0, pero sin incluir 0. Independientemente, Q puede variar desde -2,5 hasta casi 0 (por ejemplo, -0,01). Dicho de otro modo, Q puede variar desde aproximadamente -2,5 hasta cualquier valor entre -2,5 y 0, pero sin incluir cero. En ejemplos no limitativos específicos, Q puede variar desde aproximadamente -2,0 hasta 0,1, de aproximadamente -1,5 a -0,15, de aproximadamente -1,0 a -0,2, de aproximadamente -1,5 a -0,5, de aproximadamente -1,2 a -0,8, y de aproximadamente -1,0 a 0, pero sin incluir 0.

- 30 En determinadas realizaciones, la tasa de filtración glomerular se usa para determinar la función renal del sujeto animal. Por ejemplo, la tasa de filtración glomerular puede usarse para diagnosticar disfunción o enfermedad renal en el sujeto animal. Las enfermedades y trastornos renales (por ejemplo, deterioro renal, insuficiencia renal, enfermedad renal crónica, glomerulonefritis, nefropatía diabética, nefritis intersticial, enfermedad renal poliquística y enfermedad renal con hipertensión) tienden a reducir la función renal global, incluyendo la GFR, y pueden diagnosticarse usando los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede compararse la tasa de filtración glomerular en un animal que se sabe o se sospecha que tiene enfermedad con la tasa de filtración glomerular en uno o más, por ejemplo, una población de sujetos sanos. Pueden predecirse enfermedades y trastornos renales cuando la tasa del sujeto es menor que la tasa del/de los sujeto(s) sano(s). En determinadas realizaciones, si la tasa de filtración glomerular es menor de manera estadísticamente significativa que el valor promedio para una población de animales sanos de la misma especie (es decir, tal como se estima usando la correlación con [creatinina]^P[SDMA]^Q), puede diagnosticarse disfunción o enfermedad renal. En un ejemplo no limitativo, la GFR del sujeto animal es menor de manera estadísticamente significativa que la GFR promedio de la población sana cuando la diferencia es mayor que dos desviaciones estándar.

- 45 En un aspecto la divulgación se refiere a una colección de valores convencionales para la ecuación que se correlaciona con GFR o disfunción o enfermedad renal. La colección puede asociarse con una curva patrón que correlaciona el valor de la ecuación con GFR tal como se muestra en la figura 7. En otras realizaciones, los valores o la curva patrón se asocian con disfunción o enfermedad renal. Los valores convencionales pueden representarse en forma de una tabla o gráfico que consulta un profesional de la salud o en las instrucciones legibles por máquina asociadas con un dispositivo de cálculo tal como se describe en el presente documento.

- 50 En otro aspecto, puede diagnosticarse enfermedad o trastorno renal a partir de una ecuación que incluye el producto de las concentraciones de creatinina y SDMA tal como se describió anteriormente sin la etapa intermedia de determinar la GFR. Por consiguiente, usando la ecuación para generar un valor, puede compararse el valor con un valor convencional o un conjunto de valores convencionales que se sabe que están asociados con enfermedad o disfunción. En un aspecto, el cálculo se lleva a cabo en un laboratorio de referencia y el valor de la ecuación puede notificarse a un médico, veterinario u otro profesional de la salud animal. El profesional puede comparar el valor con uno o más conjuntos conocidos de valores que se correlacionan con disfunción o enfermedad renal. En otro aspecto, el laboratorio de referencia puede llevar a cabo la comparación, por ejemplo en un dispositivo de cálculo, y notificar el resultado final al médico.

En otro aspecto, la divulgación se refiere al diagnóstico de una enfermedad o trastorno renal, tal como enfermedad renal crónica (CKD), combinando los valores asociados con la concentración de SDMA y de creatinina en muestras extraídas de animales, por ejemplo muestras de suero. La fórmula usa valores de corte para SDMA y creatinina

derivados a partir de concentraciones de muestra umbral que son indicativas de enfermedad renal. Las concentraciones de corte o umbral pueden determinarse tomando muestras de una población de animales y relacionando las concentraciones de SDMA y creatinina en las poblaciones con un estado patológico tal como se conoce en la técnica. En diversas realizaciones, el punto de corte de SDMA ($SDMA_{CORTE}$) puede ser de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 $\mu\text{g/dl}$, más particularmente de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 $\mu\text{g/dl}$, e incluso más particularmente de aproximadamente 14 $\mu\text{g/dl}$. El punto de corte de creatinina puede ser de entre aproximadamente 1,3 y aproximadamente 2,5 o entre aproximadamente 1,7 y aproximadamente 2,8 mg/dl , más particularmente de aproximadamente 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7 y 2,8 mg/dl . Una vez determinados los valores de corte, puede obtenerse un valor (C) que representa una combinación de las concentraciones de SDMA y creatinina en una muestra de paciente en comparación con los valores de corte para SDMA y creatinina con la siguiente fórmula: $C = [SDMA] / SDMA_{CORTE} + [CRE] / CRE_{CORTE}$. Si C es mayor que C_{CORTE} , se diagnostica que un paciente tiene enfermedad renal.

C_{CORTE} se determina eligiendo un valor que tiene una sensibilidad y especificidad combinadas óptimas para el ensayo. La figura 13 ilustra cómo diferentes valores de C_{CORTE} afectan a la especificidad y/o sensibilidad. C_{CORTE} puede elegirse para permitir un nivel de especificidad y/o sensibilidad deseado para la detección de enfermedad renal. Por ejemplo, para el conjunto de datos mostrado en la figura 13, tanto la sensibilidad como la especificidad de detección superan el 90% cuando $C_{CORTE} = 1,6$. Normalmente, valores superiores de C_{CORTE} dan como resultado una especificidad superior pero una sensibilidad inferior. A la inversa, valores inferiores de C_{CORTE} darán normalmente como resultado una especificidad inferior pero una sensibilidad superior.

La divulgación también se refiere a un dispositivo de cálculo para realizar el cálculo descrito anteriormente, para determinar la GFR, o para diagnosticar disfunción o enfermedad renal. El dispositivo de cálculo incluye almacenamiento de memoria para instrucciones de software que, cuando se ejecutan, calculan un valor a partir de una ecuación que incluye el producto de la concentración de creatinina y la concentración SDMA libre.

En otra realización, la divulgación se refiere a un método de pronóstico para predecir muerte prematura o temprana en un paciente o sujeto animal. Según el método, los gatos tienen un riesgo aumentado de muerte temprana cuando hay una discordancia inusual entre [SDMA] y [CRE], de tal manera que el valor de SDMA está elevado hasta un grado mucho mayor que el valor de CRE, con respecto a sus valores de corte normales respectivos. En una realización, el método proporciona el pronóstico de muerte temprana cuando la razón de [SDMA]/[CRE] en suero es mayor que un determinado valor umbral T.

Por ejemplo, cuando [SDMA] se expresa en $\mu\text{g/dl}$ (microgramos/decilitro) y [CRE] se expresa en mg/dl (miligramos/decilitro), T puede adoptar un valor de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 (es decir, de aproximadamente 4 $\mu\text{g/dl}$ de SDMA:1 mg/dl de creatinina a aproximadamente 10 $\mu\text{g/dl}$ de SDMA:1 mg/dl de creatinina). En diversas realizaciones, el valor umbral T puede ser de entre aproximadamente 7 y 20, más particularmente de aproximadamente 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20. Un experto en la técnica entenderá que si la concentración de CRE y/o SDMA se expresan en unidades de medición diferentes de las unidades facilitadas anteriormente, el valor umbral de [SDMA]/[CRE] puede cambiar en consecuencia y de manera proporcional, sin afectar al espíritu y la utilidad de pronóstico del método.

Además, el riesgo de muerte prematura puede aumentar con valores crecientes de la razón de [SDMA]/[CRE]. Por ejemplo, un individuo que tiene [SDMA]/[CRE] = 40 puede tener un riesgo mayor de muerte prematura que un individuo con [SDMA]/[CRE] = 12.

Además, un aumento inusualmente repentino de [SDMA] es un pronóstico de un riesgo aumentado de muerte temprana. De manera similar, valores inusualmente altos de [SDMA] son pronósticos de un riesgo aumentado de muerte temprana. Por ejemplo, valores inusualmente altos de [SDMA] en gatos pueden ser valores por encima de aproximadamente 25 $\mu\text{g/dl}$, por encima de aproximadamente 30 $\mu\text{g/dl}$ o por encima de aproximadamente 30 $\mu\text{g/dl}$.

En un aspecto, la divulgación se refiere a la concentración de SDMA en suero que es predictiva de la mortalidad. Por ejemplo, tal como se muestra en las figuras 19 y 20, se ha mostrado que una concentración de SDMA en suero de más de 14 $\mu\text{g/dl}$ se ha asociado con mortalidad en gatos y perros. Por consiguiente, la divulgación se refiere a identificar un valor de corte de concentración de SDMA apropiado que sea lo más predictivo de mortalidad. En un aspecto, el punto de corte está en el intervalo de desde aproximadamente 10-20 $\mu\text{g/dl}$, más particularmente de aproximadamente 12-18 $\mu\text{g/dl}$, o aproximadamente 14-16 $\mu\text{g/dl}$. La identificación de una concentración de corte apropiada puede determinarse, por ejemplo, midiendo la concentración de SDMA en suero en cada miembro de un grupo de perros o gatos, y repitiendo la medición a lo largo de un periodo de varios meses o años hasta la muerte de cada miembro del grupo. Opcionalmente, a todos los perros o gatos en el grupo se les ha diagnosticado CKD. Se someten a prueba diferentes valores umbrales de valores de corte de concentración de SDMA candidatos para determinar su capacidad para predecir un tiempo de supervivencia reducido. Tales pruebas pueden realizarse, por ejemplo, mediante el uso de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier.

Pueden usarse curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para representar la predicción de mortalidad. Las curvas

de Kaplan-Meier son una manera general de tratar tiempos de supervivencia diferentes (tiempos hasta acontecimiento), especialmente cuando no todos los sujetos continúan en el estudio. Cada sujeto se caracteriza mediante tres variables: su tiempo en serie, su estado al final de su tiempo en serie (aparición de acontecimiento o censurado); el grupo de estudio en el que están (por ejemplo, SDMA < o $\geq$ 14). El acontecimiento es habitualmente un desenlace clínico tal como muerte, desaparición de un tumor, etc. El tiempo del estudio es el periodo de tiempo en el que es probable que se produzca el acontecimiento de interés desde el punto inicial. El final del estudio se alcanza antes de que todos los participantes hayan presentado este acontecimiento, aunque se desconozca el desenlace de los participantes restantes. Las figuras 19 y 20 son curvas de supervivencia de Kaplan-Meier que muestran que gatos y perros que tienen concentraciones de SDMA en suero de menos de 14 $\mu\text{g/dl}$ sobreviven aproximadamente 1,6 y 2,6 veces más tiempo (respectivamente) que gatos y perros con concentraciones de más de o iguales a 14 $\mu\text{g/dl}$. En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de determinación de la razón de creatinina con respecto a SDMA en animales sanos y enfermos, y al uso de la razón para la determinación de la enfermedad renal y mortalidad asociada con enfermedad renal. Por ejemplo, en animales sanos, la concentración de SDMA ($\mu\text{g/dl}$) y creatinina (mg/dl) está generalmente en una razón que oscila desde aproximadamente 4:1 hasta 10:1 ($\mu\text{g/dl}:\text{mg/dl}$). Sin embargo, en algunos pacientes con enfermedad renal crónica, los valores de SDMA son significativamente superiores a los valores de creatinina correspondientes, lo cual puede indicar la progresión de la enfermedad. Por consiguiente, la discordancia en la razón de SDMA:creatinina puede ser predictiva de la mortalidad en animales. Tal como se muestra en la figura 14, hay una fuerte correlación entre SDMA y creatinina, y la razón normal es de menos de 10 ($\mu\text{g/dl}:\text{mg/dl}$). Sin embargo, una razón de la concentración de SDMA (mg/ml) con respecto a creatinina (mg/dl) de más de 10 indica enfermedad renal avanzada, conduciendo con frecuencia a la muerte.

Por consiguiente, el uso de la razón de la concentración de SDMA con respecto a la concentración de creatinina en suero es predictiva de enfermedad y/o mortalidad. Por tanto, la divulgación incluye una determinación o pronóstico de enfermedad renal o muerte asociada con enfermedad renal. El método incluye determinar la concentración de SDMA y creatinina en muestra de sangre, por ejemplo, suero, de animales, en particular gatos y perros. Una vez determinadas las concentraciones puede compararse una razón de SDMA y creatinina con una razón de corte para determinar la presencia, grado o progresión de enfermedad renal y la probabilidad de muerte como resultado de enfermedad renal. La razón de corte puede ser de aproximadamente 5-15 ($\mu\text{g/dl}$ de SDMA : mg/dl de creatinina), más particularmente de aproximadamente 7-13 o aproximadamente 9-11, e incluso más particularmente de aproximadamente 10. Los animales que tienen una razón de SDMA:creatinina de más de 10 pueden caracterizarse como que tienen una probabilidad aumentada de muerte prematura. Generalmente, cuanto mayor es la razón, mayor es la probabilidad de muerte inminente. Por ejemplo, la figura 15 muestra la razón de SDMA:creatinina para una población de gatos. Dos gatos tenían razones de aproximadamente 19 y 34, y cada uno murió dentro del plazo del periodo del estudio. Las figuras 16, 17 y 18 muestran el resultado de un estudio longitudinal de tres gatos que murieron dentro del plazo de aproximadamente dos años tras identificarse que sus razones eran de más de aproximadamente 10. Uno de estos gatos murió dentro del plazo de aproximadamente un mes desde identificarse que la razón era de más de 20 (figura 18).

Una vez diagnosticada la disfunción o enfermedad renal, el método puede incluir tratar al sujeto animal para la disfunción o enfermedad renal. Los tratamientos pueden incluir, por ejemplo, diálisis, trasplante de riñón, terapia con antibióticos (por ejemplo, si la disfunción renal se debe a una infección subyacente), dietas recetadas; tratamiento de una enfermedad inflamatoria, infecciosa o neoplásica sistémica subyacente (por ejemplo, si la disfunción renal se debe a nefropatía con pérdida de proteínas); administración de fomepazol o etanol (por ejemplo, en casos de toxicidad por etilenglicol); administración de inhibidores de ACE, dieta con contenido en proteína moderadamente restringido y/o complemento de ácidos grasos omega 3 (por ejemplo, en caso de proteinuria); administración de aglutinantes de fosfato y/o una dieta con contenido en fósforo restringido (por ejemplo, en casos de hiperfosfatemia); tratamiento con líquidos i.v., terapia con líquidos subcutánea, dieta con bajo contenido en proteínas y/o antagonistas de receptor de H2 (por ejemplo, en casos de azotemia); amlodipino, atenolol y/o inhibidores de ACE (por ejemplo, en casos de hipertensión sistémica); bicarbonato y/o citrato (por ejemplo, para acidosis); administración de análogos de vitamina D tales como calcitriol o 1,25-dihidroxivitamina D, aglutinantes de fosfato (preferiblemente no basados en Ca) y/o una dieta con contenido en fósforo restringido (por ejemplo, en casos de hiperparatiroidismo secundario renal); y/o administración de antagonistas de receptor de H2 y/o eritropoyetina recombinante humana (posiblemente con complemento de hierro) (por ejemplo, en casos de anemia).

En determinadas realizaciones, la concentración de SDMA libre se determina usando los métodos inmunológicos, dispositivos y kits descritos en la solicitud de patente estadounidense provisional con n.º de serie 61/086.870 presentada el 7 de agosto de 2008, la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 12/512.479, presentada el 30 de julio de 2009, y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2010/0035274, publicada el 11 de febrero de 2010. El método puede incluir controles, calibradores o patrones que comprenden uno o más análogos de SDMA. En particular, el método puede lograrse usando técnicas de inmunoensayo bien conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, usar microplacas y dispositivos de flujo lateral. Los sujetos animales de los que se obtienen muestras para detectar SDMA incluyen sujetos humanos y animales no humanos (por ejemplo, animales de compañía, ganado, etc.). La determinación de los estados patológicos asociados con la presencia o cantidad de SDMA puede llevarse a cabo para sujetos tanto humanos como no humanos.

El formato de ensayo en fase sólida es una técnica de ensayo de unión usada habitualmente. Hay varios dispositivos y procedimientos de ensayo en los que la presencia de un analito se indica mediante la unión del analito a un conjugado y/o un elemento de unión complementario inmovilizado. En un aspecto particular, el elemento de unión inmovilizado (por ejemplo, anticuerpo anti-SDMA) está unido, o se une durante el ensayo, a una fase sólida tal como un pocillo de reacción, tira de prueba, tira reactiva, almohadilla de flujo pasante, papel, matriz de fibra u otro material en fase sólida adecuado. La reacción de unión entre SDMA libre en la muestra y anticuerpo inmovilizado se determina añadiendo a la muestra una cantidad de un análogo de SDMA, que incluye SDMA conjugada a un marcador. Tras poner en contacto la mezcla de la muestra y el análogo de SDMA con la fase sólida, se incuban la mezcla y la fase sólida para permitir la unión entre el anticuerpo inmovilizado, la SDMA y el análogo de SDMA. Tras la incubación, se retiran reactivos no unidos de la fase sólida. Se mide la cantidad del marcador que se asocia con el anticuerpo mediante unión del anticuerpo al análogo. La cantidad del marcador asociado con el anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de SDMA libre en la muestra.

Se realiza la inmovilización de uno o más anticuerpos frente a SDMA sobre un dispositivo o soporte sólido de modo que los anticuerpos no se eliminarán mediante lavado por la muestra, diluyente y/o procedimientos de lavado. Pueden fijarse uno o más anticuerpos a una superficie mediante adsorción física (es decir, sin el uso de grupos de unión químicos) o mediante unión química (es decir, con el uso de grupos de unión químicos). La unión química puede generar una fijación más fuerte de anticuerpos sobre una superficie y proporcionar orientación y conformación definidas de las moléculas unidas a la superficie.

En otra realización, se unen anticuerpos frente a SDMA producidos en una especie particular a un soporte sólido mediante interacción con un anticuerpo anti-especie que está unido al soporte. En un aspecto particular, se producen anticuerpos anti-SDMA en conejos, y el soporte tiene unido al mismo anticuerpo anti-conejo que reconoce el anticuerpo anti-SDMA producido en conejos. En este aspecto, el anticuerpo puede estar en forma de anticuerpo anti-suero obtenido a partir de la especie. O bien pueden aplicarse los anticuerpos anti-SDMA a la fase sólida que tiene el anticuerpo anti-especie antes de añadir la muestra a la fase sólida, o bien pueden mezclarse los anticuerpos anti-SDMA con la muestra antes de añadir la muestra a la fase sólida. En cualquier caso, los anticuerpos anti-SDMA se unen a la fase sólida mediante unión al anticuerpo anti-especie en la fase sólida.

En otra realización, pueden mezclarse uno o más anticuerpos marcados con una muestra de prueba antes de la aplicación de la mezcla a un soporte sólido. En este caso, puede fijarse un análogo de SDMA al soporte sólido de modo que el análogo no se eliminará mediante lavado por la muestra, diluyente y/o procedimientos de lavado. Los anticuerpos marcados en la muestra se unen a SDMA en la muestra y, por tanto, no están disponibles para unirse con el análogo de SDMA en el soporte sólido. Tras la aplicación de la mezcla al soporte sólido, y una incubación apropiada, se lava la mezcla del soporte sólido. Los anticuerpos que no se han unido a SDMA de muestra se unirán al análogo de SDMA en el soporte sólido. La presencia o cantidad de SDMA en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpo que se ha unido al análogo de SDMA. La señal asociada con el marcador en el anticuerpo puede medirse mediante el método apropiado.

La figura 1 muestra una comparación de, y método de ELISA de detección de, SDMA en sueros caninos combinados con adiciones conocidas de SDMA y la detección de SDMA usando espectrometría de masas. Tal como se muestra, los valores de concentraciones de SDMA obtenidos usando el ELISA descrito en el presente documento se correlacionan fuertemente con los obtenidos usando EM.

La detección de los complejos de anticuerpo:antígeno puede lograrse mediante una variedad de técnicas bien conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, turbidimetría, marcaje enzimático, radiomarcaje, luminiscencia o fluorescencia. Los expertos habituales en la técnica conocen metodologías de inmunoensayo y se aprecia que incluyen, pero no se limitan a, radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA), inmunoensayos de polarización con fluorescencia (FPIA), inmunoensayos enzimáticos de micropartículas (MEIA), ensayos de tecnología de inmunoensayo con multiplicación por enzimas (EMIT), ensayos inmunoturbidométrico o de aglutinación, inmunoensayos basados en oro coloidal incluyendo dispositivos de flujo lateral e inmunoensayos magnéticos quimioluminiscentes (CMIA). En RIA, se marca un anticuerpo o antígeno con radioactividad y se usa en un formato competitivo o no competitivo. En EIA, se marca un anticuerpo o antígeno con una enzima que convierte un sustrato en un producto con una señal resultante que se mide, tal como un cambio de color. En FPIA, se marca un antígeno con marcador fluorescente y compete con antígeno sin marcar de la muestra. La cantidad de analito medida es inversamente proporcional a la cantidad de señal medida. En MEIA, se recubre una micropartícula en fase sólida con anticuerpos contra un antígeno de interés y se usa para capturar el analito. El anticuerpo para la detección se marca con una enzima como en el método de EIA. La concentración de analito medida es proporcional a la cantidad de señal medida. En CMIA, se conjuga un marcador quimioluminiscente con el anticuerpo o antígeno, y produce luz cuando se combina con su sustrato. CMIA puede configurarse en un formato competitivo o no competitivo, y produce resultados que son inversa o directamente proporcionales a la cantidad de analito presente, respectivamente.

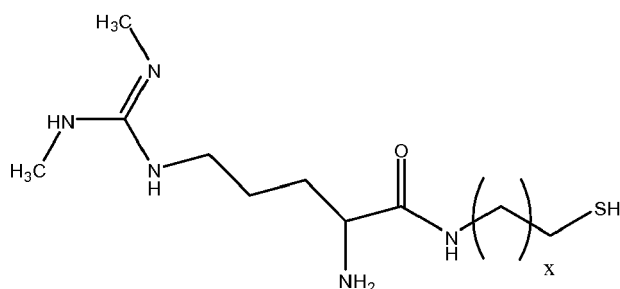
También se conoce bien el uso de tiras reactivas impregnadas con reactivo en ensayos de unión específica. En tales procedimientos, se aplica una muestra de prueba a una porción de la tira reactiva y se deja que migre o se desplace por efecto mecha a través del material de tira. Por tanto, el analito que va a detectarse o medirse pasa a través o a

lo largo del material, posiblemente con la ayuda de un disolvente de elución que puede ser la propia muestra de prueba o una disolución añadida por separado. El analito migra al interior de una zona de captura o detección en la tira reactiva, en la que está inmovilizado un elemento de unión complementario al analito. El grado en el que se une el analito en la zona de detección puede determinarse con la ayuda del conjugado que también puede incorporarse en la tira reactiva o que puede aplicarse por separado. En una realización, un anticuerpo específico para SDMA está inmovilizado en un soporte sólido en una ubicación diferenciada. Tras la adición de la muestra, puede realizarse la detección de complejos de SDMA-anticuerpo en el soporte sólido mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.726.010, describe un ejemplo de un dispositivo de flujo lateral, el dispositivo de inmunoensayo SNAP® (IDEXX Laboratories).

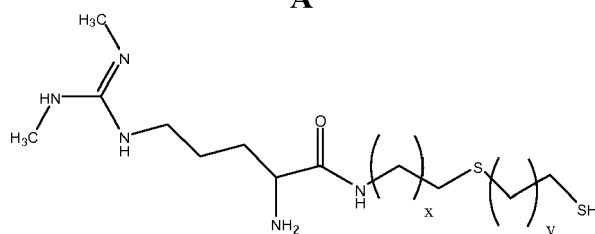
Otras tecnologías de detección emplean partículas magnéticas o microperlas, por ejemplo, perlas de polímero impregnadas con óxido de hierro superparamagnético. Estas perlas están asociadas, por ejemplo, con una pareja de unión específica para el analito. Las perlas se unen con los analitos diana en la muestra que está sometida a prueba y después se aíslan normalmente o se separan de la disolución de manera magnética. Una vez producido el aislamiento, pueden llevarse a cabo otras pruebas, incluyendo observación de imágenes particulares o marcadores, ya sea directamente de manera óptica o por medio de una cámara.

En realizaciones adicionales, análogos de SDMA, particularmente análogos de SDMA que contienen tiol, que contienen hidroxilo, que contienen amino y que contienen carboxilato, permiten que la SDMA se una a otra molécula (diana de conjugación), tal como una proteína activada, para formar un conjugado de SDMA. Los análogos de SDMA descritos en el presente documento permiten que la SDMA se una a una diana de conjugación tal como una proteína, polipéptido, marcador detectable, soporte sólido y similares para proporcionar el conjugado de SDMA. Los conjugados de SDMA descritos en el presente documento pueden usarse para producir anticuerpos para su uso en inmunoensayos específicos para SDMA. Los anticuerpos tienen poca o ninguna reactividad cruzada con arginina, ADMA y/o monometilarginina. Los análogos de SDMA también pueden conjugarse con un marcador para su uso en inmunoensayos específicos para SDMA.

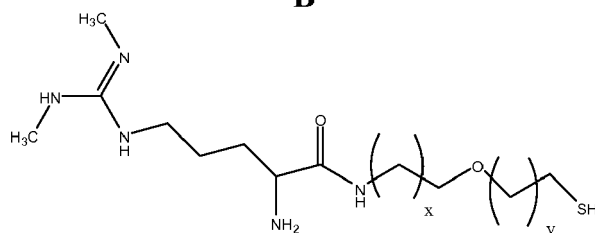
Los análogos de SDMA pueden tener, por ejemplo, las siguientes estructuras:



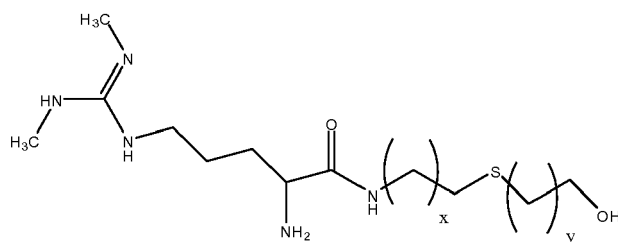
A



B

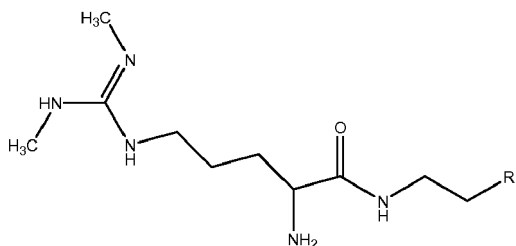


C

**D**

en las que x e y son números enteros que oscilan desde 1 hasta 5.

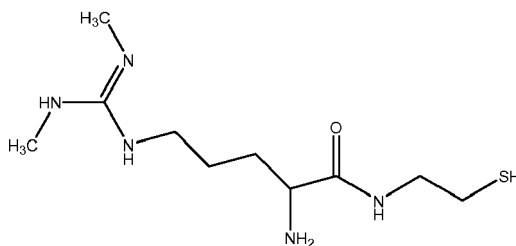
- 5 Según una realización, los análogos de SDMA tienen la siguiente fórmula general:



- 10 en la que R₁ puede ser un grupo tiol (o tiol protegido), un hidroxilo (o hidroxilo protegido), un amino (o amino protegido) o un grupo carboxilato (incluyendo ácido carboxílico) o carboxilato protegido.

Los expertos en la técnica conocen grupos protectores de tiol, hidroxilo, amino y carboxilato adecuados tales como los descritos, por ejemplo, en T.W. Greene, *et al.* Protective Groups in Organic Synthesis, 3^a ed. (1999).

- 15 En una realización particular, el análogo de SDMA es un compuesto de fórmula (3):

**(3)**

- 20 o una sal del mismo. El compuesto de fórmula (3) proporciona un tiol disponible que puede reaccionar con una diana de conjugación que incluye un "sitio reactivo con tiol" apropiado, es decir, un sitio que reaccionará con un grupo tiol. Por ejemplo, maleimidas, haluros de alquilo y arilo, y alfa-haloacilos son sitios reactivos con tiol ilustrativos que pueden reaccionar con tioles para formar tio-éteres. De manera similar, disulfuros de piridilo pueden reaccionar con tioles para formar disulfuros mixtos.

- 25 En otra realización, R₁ es X-R₂, en el que X es -S-, -O-, -N- o -COO- y R₂ es un marcador que tiene un grupo reactivo con tiol, hidroxilo, amino o carboxilato.

- 30 En una realización, R₁ es X-R₂, en el que X es -S-, -O-, -N- o -COO- y R₂ es una proteína que se ha funcionalizado para incluir un grupo reactivo con tiol, hidroxilo, amino o carboxilato.

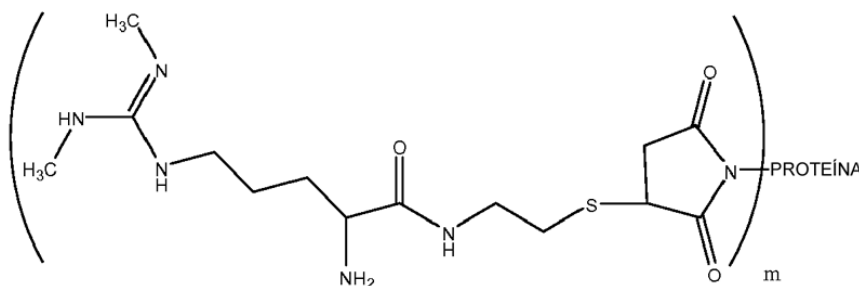
- 35 En una realización, SDMA se conjuga con una proteína portadora para formar un inmunógeno de "hapteno-portador" que puede usarse para estimular una respuesta inmunitaria frente a un epítipo que incluye SDMA. Las proteínas inmunogénicas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, BSA, KLH y ovalbúmina. En la técnica se conocen protocolos para conjugar haptenos a proteínas inmunogénicas (véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, E. Harlow and D. Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, NY, 1988) págs. 78-87).

En una realización, el análogo de SDMA se conjuga con una proteína activada por maleimida, tal como, por ejemplo, proteína de lapa californiana (KLH) activada por maleimida o albúmina de suero bovino (BSA) activada por

maleimida.

En una realización, el compuesto de fórmula (3) se conjuga con una proteína activada por maleimida, tal como, por ejemplo, proteína de lapa californiana (KLH) activada por maleimida o albúmina de suero bovino (BSA) activada por maleimida.

Por tanto, en una realización específica, un conjugado de un compuesto de fórmula (3) y proteína activada por maleimida tiene la fórmula:



en la que m es un número entero.

Normalmente, m es mayor de 5. Sin embargo, el valor para m es variable. Por ejemplo, m es de aproximadamente 15 grupos maleimida por proteína en BSA activada por maleimida comercialmente disponible de Sigma-Aldrich de St. Louis, MO; m es de aproximadamente 80 grupos maleimida por proteína en KLH activada por maleimida comercialmente disponible de Sigma-Aldrich; m está en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 grupos maleimida por proteína en BSA activada por maleimida comercialmente disponible de Thermo Scientific Pierce Protein Research Products de Rockford, IL; m es mayor de aproximadamente 400 grupos maleimida por proteína en KLH activada por maleimida comercialmente disponible de Thermo Scientific Pierce Protein Research Products; y m está en un intervalo de aproximadamente 150 a aproximadamente 300 grupos maleimida por proteína en KLH activada por maleimida comercialmente disponible de A. G. Scientific de San Diego, CA. En general, m está limitado por el número de grupos amina disponibles presentes en una proteína inmunogénica. El número de aminas disponibles puede aumentarse conjugando la proteína inmunogénica con poliaminas.

En una realización, PROTEÍNA es BSA y m es mayor de aproximadamente 5. En una realización, PROTEÍNA es BSA y m es mayor de aproximadamente 10. En una realización, PROTEÍNA es BSA y m es mayor de aproximadamente 25. En una realización, PROTEÍNA es BSA y m es mayor de aproximadamente 50. En una realización, PROTEÍNA es BSA y m es mayor de aproximadamente 75. En una realización, PROTEÍNA es BSA y m está en un intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 80. En una realización, PROTEÍNA es BSA y m es mayor de aproximadamente 75. En una realización, PROTEÍNA es BSA y m está en un intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 80. En una realización, PROTEÍNA es BSA y m es mayor de aproximadamente 75. En una realización, PROTEÍNA es BSA y m está en un intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 80. En una realización, PROTEÍNA es BSA y m es mayor de aproximadamente 75. En una realización, PROTEÍNA es BSA y m está en un intervalo de aproximadamente 30 a aproximadamente 80.

En una realización, PROTEÍNA es KLH y m es mayor de aproximadamente 5. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m es mayor de aproximadamente 50. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m es mayor de aproximadamente 100. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m es mayor de aproximadamente 200. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m es mayor de aproximadamente 300. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m es mayor de aproximadamente 400. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m es mayor de aproximadamente 500. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m es mayor de aproximadamente 600. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m es mayor de aproximadamente 700. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m es mayor de aproximadamente 800. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m está en un intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 800. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m en un intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 600. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m en un intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 400. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m en un intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 200. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m en un intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 100. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m en un intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 200. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m oscila en un intervalo de 100 a aproximadamente 300. En una realización, PROTEÍNA es KLH y m en un intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 400. En diversos aspectos, PROTEÍNA es KLH y m en un intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 500, de aproximadamente 100 a aproximadamente 600, de aproximadamente 100 a aproximadamente 700, de aproximadamente 100 a aproximadamente 800, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000.

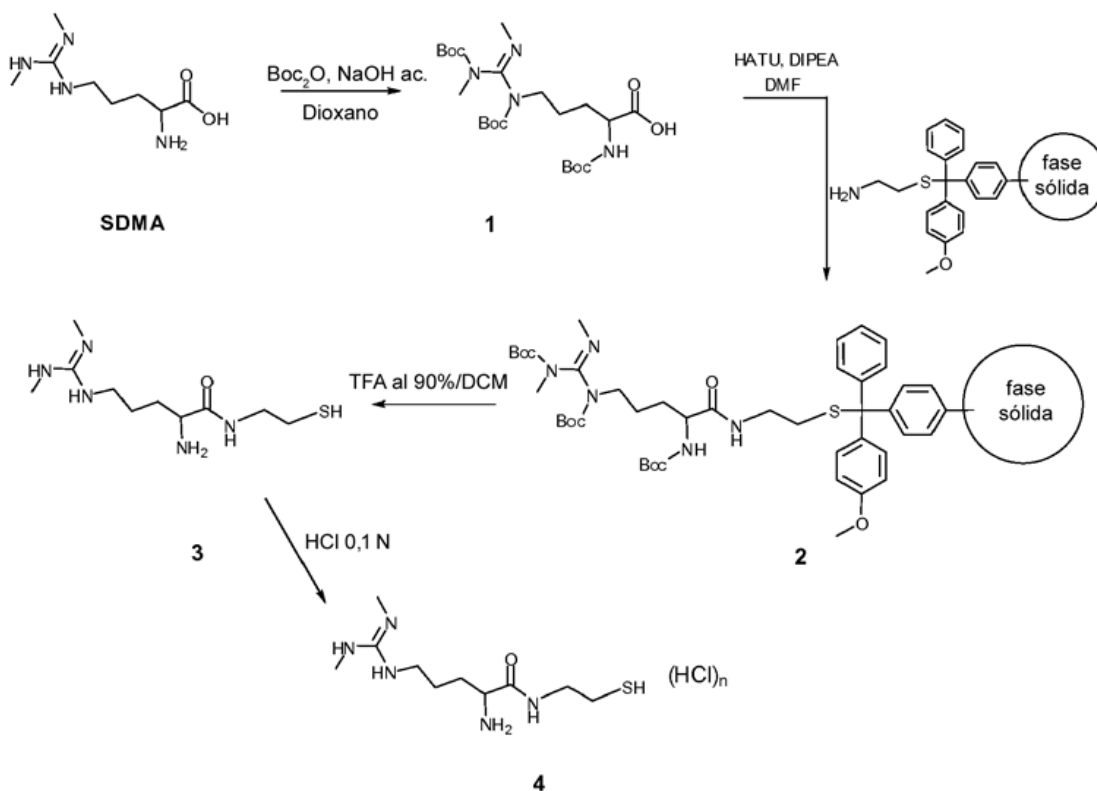
El conjugado de un compuesto de fórmula (3) y proteína activada por maleimida puede caracterizarse usando

métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sigma-Aldrich Technical Bulletin for maleimide activated BSA, KLH Conjugation Kit (n.º de catálogo MBK1)).

En una realización alternativa, el análogo de SDMA se une a un marcador detectable a través del grupo tiol, hidroxilo, amino o carboxilato. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos, colorante quimioluminiscente, marcadores electroquímicos, quelatos de metales, partículas de látex o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar una alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable (por ejemplo, enzimas tales como peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina y similares). El marcador puede ser una molécula de unión específica que puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, biotina, avidina, estreptavidina, digoxigenina, maltosa, oligohistidina, 2,4-dinitrobenzato, fenilarseniato, ADNcs, ADNcd, etc.). La SDMA puede unirse a un marcador detectable usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Como ejemplo ilustrativo, el análogo de SDMA puede unirse a peroxidasa activada por maleimida, a partir de polvo liofilizado de rábano, a más de aproximadamente 200 unidades/mg de proteína (comercialmente disponible de Sigma-Aldrich St. Louis, MO (n.º de catálogo P1709) siguiendo las instrucciones en el manual de producto).

El análogo de fórmula (3) puede prepararse a partir de SDMA (comercialmente disponible de EMD Chemicals Inc. de Gibbstown, NJ) mediante el siguiente esquema de síntesis ilustrativo (1):

Esquema 1:

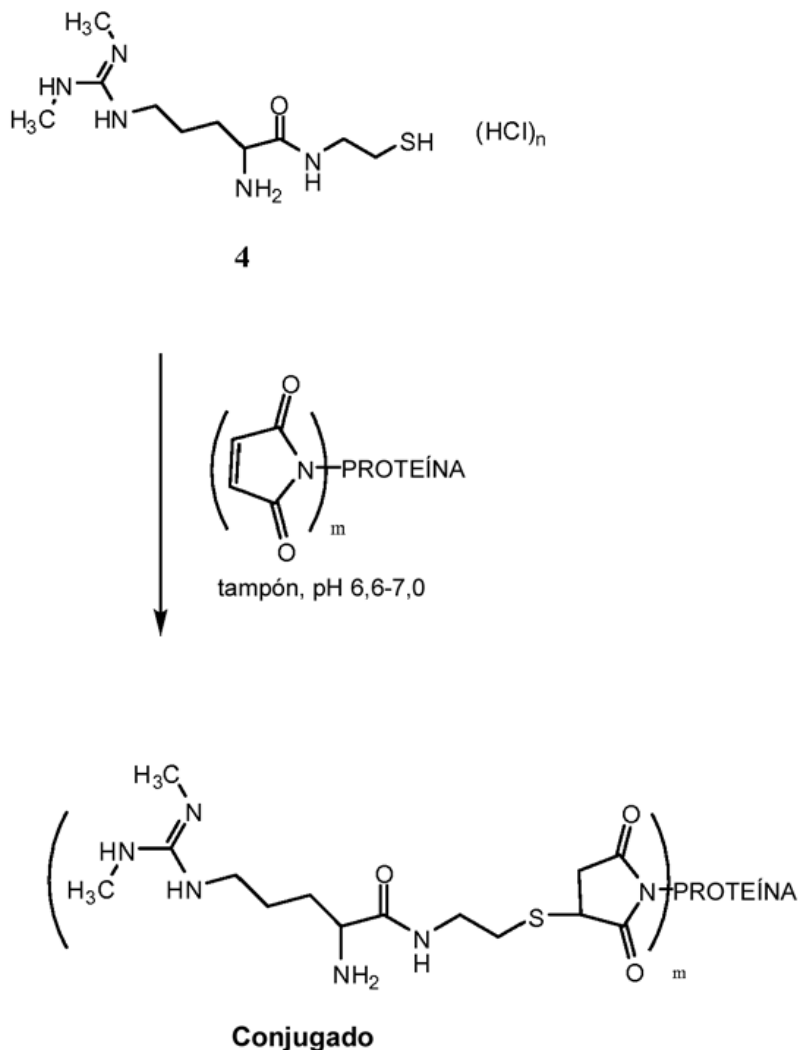


Se protegen los grupos amino primario y secundario de SDMA haciendo reaccionar SDMA con dicarbonato de di-terc-butilo (Boc_2O). Después se une la SDMA protegida con terc-butoxicarbonilo (BOC) resultante ((Boc_3)-SDMA, 1) a una resina. Por ejemplo, la (Boc_3)-SDMA (1) puede unirse a una resina de cisteamina-4-metoxitritilo (comercialmente disponible de EMD Chemicals, Inc. de Gibbstown, NJ) poniendo en contacto la (Boc_3)-SDMA (1) con la resina en presencia de metanamino de hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurano (HATU) y N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) en dimetilformamida (DMF) para proporcionar (Boc_3)-SDMA-cistamida unida a resina (2). Se retiran los grupos protectores BOC en la (Boc_3)-SDMA-cistamida unida a resina (2) y se escinde la SDMA-cistamida unida a resina resultante de la resina usando, por ejemplo, ácido trifluoroacético en diclorometano, para proporcionar SDMA-cistamida (3), que se convirtió en la sal de clorhidrato (4) mediante reacción con ácido clorhídrico.

Los análogos de fórmula A-D, descritas anteriormente, pueden prepararse usando metodologías similares tal como se describe en el esquema 1.

Después puede hacerse reaccionar proteína activada por maleimida con SDMA-cistamida (3) para proporcionar un conjugado con proteína de SDMA-cistamida tal como se describe a continuación en el esquema II:

Esquema II:



5 en el que n es un número entero que oscila desde 1 hasta 3 y m es un número entero tal como se definió anteriormente.

El conjugado resultante puede purificarse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía en columna, por ejemplo, usando cromatografía en columna en filtración en gel con Sephadex (por ejemplo, Sephadex G-25M) como soporte sólido (comercialmente disponible de Sigma-Aldrich).

Pueden prepararse conjugados de análogos A-D usando metodologías similares tal como se describe en el esquema 2.

15 El conjugado del análogo de fórmula A-D y KLH activada por maleimida o BSA activada por maleimida puede usarse como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen sustancialmente a SDMA (es decir, anticuerpos anti-SDMA) y no muestran ninguna o sustancialmente ninguna reactividad cruzada con ADMA, L-arginina y/o N-metilarginina. El conjugado del análogo de fórmula (3) y KLH activada por maleimida o BSA activada por maleimida puede usarse como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen sustancialmente a SDMA (es decir, anticuerpos anti-SDMA). Tales anticuerpos no muestran ninguna o sustancialmente ninguna reactividad cruzada con ADMA, L-arginina y/o N-metilarginina.

25 Los anticuerpos anti-SDMA útiles en los métodos, dispositivos y kits de la divulgación se caracterizan por una unión de alta afinidad a SDMA con poca o ninguna reactividad cruzada frente a ADMA, arginina y/o monometilarginina. Por consiguiente, en el presente documento se describen anticuerpos anti-SDMA aislados, recombinantes, sintéticos y/o producidos *in vivo*, así como métodos de preparación y uso de tales anticuerpos, incluyendo composiciones, métodos y dispositivos de diagnóstico y terapéuticos. Los anticuerpos anti-SDMA descritos en el presente documento son útiles, por ejemplo, como marcador de diagnóstico para la función renal, tal como deterioro renal,

insuficiencia renal, tasa de filtración glomerular (GFR), aclaramiento de inulina y aclaramiento de creatinina, y para trastornos/enfermedades renales, tales como enfermedad renal crónica, glomerulonefritis, nefropatía diabética, nefritis intersticial, enfermedad renal poliquística y enfermedad renal con hipertensión.

En una realización, los anticuerpos generados son capaces de detectar SDMA libre (es decir, SDMA que no forma parte de una cadena de polipéptido) y no muestran ninguna o sustancialmente ninguna reactividad cruzada con ADMA, L-arginina y/o N-metilarginina. Tal como se muestra en los ejemplos, los anticuerpos descritos en el presente documento muestran menos del 1% de reactividad cruzada con ADMA, L-arginina y/o N-metilarginina, basándose en concentraciones iguales de los antígenos. Tal como se entiende generalmente en la técnica, el impacto de la reactividad cruzada dependerá de la abundancia relativa del antígeno de reacción cruzada (por ejemplo, ADMA, L-arginina y/o N-metilarginina) en comparación con el antígeno de inmunización (SDMA) en una muestra de prueba. Por ejemplo, una reactividad cruzada de hasta el 50% puede ser aceptable si la concentración del antígeno de inmunización es 100 veces mayor que la del antígeno de reacción cruzada. A la inversa, una reactividad cruzada de tan sólo el 1% puede ser problemática si la concentración del antígeno de reacción cruzada es 100 veces la del antígeno de inmunización. Por consiguiente, el impacto de la reactividad cruzada debe considerarse en el contexto de las abundancias relativas de cualquier antígeno de reacción cruzada y el antígeno de inmunización, en la muestra que va a analizarse. En los diversos aspectos de la divulgación, la reactividad cruzada no afecta a la unión sustancial de SDMA o análogo de SDMA a un anticuerpo anti-SDMA.

Los métodos para producir los anticuerpos pueden incluir usar uno o más conjugados de SDMA como inmunógeno para estimular una respuesta inmunitaria. Los métodos incluyen administrar uno o más conjugados de SDMA a un animal usando un protocolo de inmunización adecuado, y separar un anticuerpo apropiado de un(os) líquido(s) corporal(es) del animal, tal como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 3, a continuación. Alternativamente, los conjugados de SDMA pueden usarse en métodos de presentación de fago para seleccionar fagos que presentan en su superficie un anticuerpo apropiado, seguido por separación de secuencias de ácido nucleico que codifican para al menos una región de dominio variable de un anticuerpo apropiado. Los expertos habituales en la técnica conocen bien métodos de presentación de fago. (Véase, por ejemplo, Antibody Phage Display; Methods in Molecular Biology, vol. 178, O'Brien, Philippa M.; Aitken, Robert (Eds.) 2002). Pueden prepararse anticuerpos monoclonales frente a SDMA mediante métodos conocidos generalmente en la técnica.

Los análogos de SDMA descritos en el presente documento pueden unirse a un marcador para proporcionar un conjugado detectable para su uso en ensayos de unión a receptor, tales como inmunoensayos para detectar SDMA. De manera similar, los anticuerpos anti-SDMA pueden unirse a un marcador para proporcionar anticuerpos anti-SDMA detectable para su uso en ensayos de unión a receptor, tales como inmunoensayos para detectar SDMA. Los análogos de SDMA y anticuerpos anti-SDMA pueden unirse a un marcador usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, Immunochemical Protocols; Methods in Molecular Biology, vol. 295, editado por R. Burns (2005)). El conjugado de SDMA detectable o anticuerpos anti-SDMA detectables pueden usarse en diversos formatos de ensayo homogéneos, de tipo sándwich, competitivos o no competitivos, para generar una señal que está relacionada con la presencia o cantidad de una SDMA en una muestra de prueba.

En una realización específica, las metodologías de inmunoensayo son inmunoensayos competitivos para la detección de anticuerpos anti-SDMA. El inmunoensayo competitivo puede llevarse a cabo de la siguiente manera ilustrativa. Se pone una muestra, de un líquido corporal de un animal, que contiene posiblemente anticuerpos anti-SDMA, en contacto con un análogo de SDMA conjugado a un soporte sólido y con un anticuerpo anti-SDMA conjugado a un marcador detectable. Los anticuerpos anti-SDMA de interés, presentes en la muestra, compiten con el anticuerpo anti-SDMA conjugado a un marcador detectable para unirse con el análogo de SDMA conjugado a un soporte sólido. La cantidad del marcador asociado con el soporte sólido puede determinarse tras separar anticuerpos no unidos y el soporte sólido. En una realización alternativa, el inmunoensayo competitivo se lleva a cabo de la siguiente manera ilustrativa. Se pone una muestra, de un líquido corporal de un animal, que contiene posiblemente anticuerpos anti-SDMA, en contacto con un análogo de SDMA unido a un marcador detectable y después con un anticuerpo conjugado a un soporte sólido. Los anticuerpos anti-SDMA en la muestra compiten con los anticuerpos anti-SDMA en el soporte sólido para unirse con el conjugado de SDMA unido a un marcador detectable. En cualquier caso, la señal obtenida está inversamente relacionada con la cantidad de anticuerpo frente a SDMA de interés presente en la muestra.

Evidentemente, pueden usarse otros métodos de medición de SDMA libre en los métodos descritos en el presente documento. La propia SDMA puede ser predictiva de enfermedad (véanse las figuras 2 y 3).

La concentración de creatinina en suero puede medirse de una variedad de maneras, tal como conoce el experto en la técnica. Por ejemplo, puede usarse un analizador químico Catalyst Dx™ o un analizador químico VetTest® con portaobjetos secos adaptados para someter a prueba para detectar creatinina, por ejemplo, los comercialmente disponibles de IDEXX Laboratories. También pueden usarse otros analizadores y portaobjetos, tales como el analizador VITROS® 950 y los portaobjetos VITROS® CREA disponibles de Ortho Clinical Diagnostics. También pueden usarse ensayos enzimáticos en húmedo. Por ejemplo, el experto en la técnica puede usar un método de química enzimática en húmedo en un analizador Integra 800. Un ensayo particular se basa en un sistema de creatininasas/creatininas/sarcosina oxidasa con detección a 552 nm y determinación de blanco de absorbancia a

659 nm. El experto en la técnica también puede usar métodos colorimétricos, por ejemplo, los basados en picrato tales como el ensayo de Jaffe. También pueden usarse otros métodos conocidos por el experto en la técnica, tales como los descritos en la publicación de patente estadounidense n.º 2005/0266574 y la patente estadounidense n.º 4.818.703, para medir la concentración de creatinina. En determinadas realizaciones, la medición de la concentración de creatinina se realiza usando espectrometría de masas con dilución de isótopo.

Se conocen varios métodos de determinación de la GFR. Por ejemplo, puede determinarse la GFR como el aclaramiento renal de ^{125}I -iotalamato, tal como se describe en Perrone *et al.*, Am. J. Kidney Disease, vol. 16, págs. 224-35 (1990) y Levey *et al.*, J. Am. Soc. Nephrol., vol. 4, págs. 1159-71 (1993). También pueden usarse otros métodos basados en recogida de orina, incluyendo medir el aclaramiento renal de otras sustancias exógenas, por ejemplo ^{51}Cr -EDTA, ^{99}Tc -DTPA, iohexol o inulina. Los valores de GFR obtenidos mediante cualquiera de estos métodos pueden correlacionarse con el producto inverso de las concentraciones de creatinina y SDMA libre para muestras recogidas aproximadamente al mismo tiempo con el fin de proporcionar una curva de calibración o valores convencionales para su uso en los métodos descritos en el presente documento.

Lo siguiente se proporciona únicamente con propósitos de mostrar a modo de ejemplo.

Ejemplos

Ejemplo 1: síntesis de la SDMA-cistamida (3) y sal de clorhidrato de SDMA-cistamida (4)

Se preparó SDMA-cistamida (3) según la ruta de síntesis descrita en el esquema 1.

(BOC) $_3$ -SDMA (1): A una disolución de 4,36 g (20 mmol) dicarbonato de di-terc-butilo (Boc $_2$ O) en 20 ml de dioxano se le añadieron gota a gota 550 mg (2,0 mmol) de diclorhidrato de N,N-dimetilarginina (SDMA) (comercialmente disponible de EMD Chemicals Inc. de Gibbstown, NJ) disuelto en 10 ml de NaOH 5,0 N a lo largo de 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se agitó la mezcla de reacción resultante durante la noche. Después se añadieron 30 ml de diclorometano (DCM) y 30 ml de agua a la mezcla de reacción y se ajustó el pH a 6,5 con ácido acético (AcOH). Se separó la fase de DCM, se lavó con salmuera y se secó sobre Na $_2$ SO $_4$ anhidro. Después se eliminó el DCM a presión reducida para proporcionar un sólido. Se lavó el sólido resultante 2 veces con 10 ml de hexano. Después se secó el sólido a vacío para proporcionar 800 mg de un sólido de color amarillo claro. Las reacciones posteriores no requirieron purificación adicional. Se caracterizó el sólido mediante espectrometría de masas. ESI-EM: 525,7 (M + Na) $^+$, 503,6 (M + 1) $^+$, 403,5 (M - Boc + 1) $^+$, 303,5 (M - 2Boc + 1) $^+$.

(Boc) $_3$ -SDMA-cistamina-resina (2): A una mezcla de 600 mg (1,2 mmol) de (Boc) $_3$ -SDMA (1) y 627 mg (1,6 mmol) de metanamino de hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) en 15 ml de dimetilformamida (DMF) se le añadieron 420 μl (2,4 mmol) de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA). Después se agitó la mezcla resultante durante 20 minutos bajo una atmósfera de N $_2$ seco. Por separado, se hinchó resina de cistamina-4-metoxitritilo (1,0 g) (comercialmente disponible de EMD Chemicals, Inc. de Gibbstown, NJ) y se lavó usando DMF. Después se añadió la resina hinchada a la mezcla de reacción y se agitó suavemente la mezcla de reacción bajo una atmósfera de N $_2$ durante tres horas. Después se recogió la resina mediante filtración, y se lavó consecutivamente con 5 ml de DMF, 5 ml de metanol y 5 ml de DCM.

SDMA-cistamida (3): A la resina modificada se le añadieron 15 ml de ácido trifluoroacético al 90% (TFA), se agitó suavemente la mezcla resultante durante dos horas y se filtró. Se lavó la resina dos veces con 3 ml de TFA/DCM (1:1 (v/v)). Se combinaron el filtrado y los lavados y se añadieron a 200 ml de éter frío para proporcionar un precipitado. Se recogió el precipitado resultante mediante centrifugación y se secó a presión reducida para proporcionar 300 mg de SDMA-cistamida (3). Se caracterizó la SDMA-cistamida (3) mediante espectrometría de masas. ESI-EM: 262,4 (M + 1) $^+$, 132,0 (M + 2) $^+$.

Sal de clorhidrato de SDMA-cistamida (4): Se reconstituyó SDMA-cistamida 3 (300 mg) en 5 ml de HCl 1,0 N y se liofilizó la mezcla resultante para proporcionar un sólido de color amarillo claro como una espuma.

Puede usarse el mismo procedimiento general tal como se describió anteriormente para preparar otros análogos de SDMA.

Ejemplo 2: conjugación de SDMA-cistamida (3) con proteína activada por maleimida

A. Procedimiento general para conjugar SDMA-cistamida (3) con KLH activada por maleimida:

1. Se abrió lentamente un vial de KLH activada por maleimida (comercialmente disponible de Sigma-Aldrich St. Louis, MO (n.º de catálogo K0383)) para liberar el vacío.

2. Se reconstituyó el contenido del vial con 1 ml de agua para proporcionar una disolución 5 mg/ml de KLH activada por maleimida en tampón de fosfato de sodio 20 mM con NaCl 230 mM, EDTA 2 mM, y sacarosa 80 mM, pH 6,6.

3. Se preparó una disolución de tampón de conjugación de tampón de fosfato de sodio 20 mM con EDTA 100 mM y sacarosa 80 mM, pH 6,6 reconstituyendo tampón de conjugación (comercialmente disponible de Sigma-Aldrich St. Louis, MO (n.º de catálogo C3957)) con 10 ml de agua.

4. Se disolvieron aproximadamente 0,8 mg de hapteno (es decir, SDMA-cistamida (3)) en 0,5 ml de tampón de conjugación. Se conservaron 50 µl de la disolución de péptido resultante para la determinación de la eficiencia de acoplamiento (hap-total). La disolución de hapteno conservada se almacenó a 2-8°C.

5. Se mezcló inmediatamente la disolución de hapteno de la etapa 4 con la disolución de KLH activada por maleimida de la etapa 2 en un vial de reacción equipado con barra de agitación. Se desgasificó la mezcla resultante mientras se agitaba bajo una corriente de nitrógeno suave durante aproximadamente 1-2 minutos.

6. Se tapó el vial de reacción y continuó la agitación a temperatura ambiente durante 2 horas o durante la noche a 2-8°C.

7. Se conservaron 100 µl de la reacción de conjugación de la etapa 6 (hap-libre) para la determinación de la eficiencia de acoplamiento.

B: Procedimiento general para conjugar SDMA-cistamida (3) con BSA activada por maleimida:

1. Se abrió lentamente un vial de BSA activada por maleimida (comercialmente disponible de Sigma-Aldrich St. Louis, MO (n.º de catálogo B7542)) para liberar el vacío.

2. Se reconstituyó el contenido del vial con 1 ml de agua para proporcionar una disolución 5 mg/ml de BSA activada por maleimida en tampón de fosfato de sodio 20 mM con NaCl 230 mM, EDTA 2 mM, y sacarosa 80 mM, pH 6,6.

3. Se disolvieron 5 mg de hapteno (es decir, SDMA-cistamida (3)) en 0,5 ml de tampón de conjugación (preparado tal como se describió anteriormente en la etapa A3). Se conservaron 50 µl de la disolución de péptido resultante para la determinación de la eficiencia de acoplamiento (hap-total). La disolución de hapteno conservada se almacenó a 2-8°C.

4. Se mezcló inmediatamente la disolución de hapteno de la etapa 3 con la disolución de BSA activada por maleimida de la etapa 2 en un vial de reacción equipado con barra de agitación. Se desgasificó la mezcla resultante mientras se agitaba bajo una corriente de nitrógeno suave durante aproximadamente 1-2 minutos.

5. Se tapó el vial de reacción y continuó la agitación a temperatura ambiente durante 2 horas o durante la noche a 2-8°C.

6. Se conservaron 100 µl de la reacción de conjugación de la etapa 5 (hap-libre) para la determinación de la eficiencia de acoplamiento.

C: Aislamiento de conjugados de KLH o BSA:

1. Se disolvió el contenido de un paquete de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (comercialmente disponible de Sigma-Aldrich St. Louis, MO (n.º de catálogo P3813)) en 1 litro de agua.

2. Se soportó una columna de filtración en gel de Sephadex G-25M (comercialmente disponible de Sigma-Aldrich St. Louis, MO (n.º de catálogo B4783)) sobre un vaso de precipitados.

3. Se retiró la tapa de la parte superior de la columna, se abrió mediante corte la punta de la columna, y se dejó que fluyera a través el exceso de líquido. No se permitió que se secase la columna.

4. Se equilibró la columna con 30 ml de PBS.

5. Se aplicó la mezcla de reacción del ejemplo 2A o 2B a la columna.

6. Se eluyó la columna con PBS, usando un volumen total de aproximadamente 10 ml y se recogieron fracciones de aproximadamente 0,5-1,0 ml. Se monitorizó la presencia de proteína en las fracciones midiendo la absorbancia de cada fracción a 280 nm.

7. Se combinaron las fracciones que contenían proteína. La figura 4 representa gráficamente la absorción frente al número de fracción de un perfil de elución ilustrativo para las proteínas KLH (♦) y BSA (■).

8. Se dividieron las fracciones que contenían proteína en pequeñas alícuotas que se almacenaron congeladas a

-20°C.

D. Ensayo para determinar la eficiencia de acoplamiento:

- 5 1. Ensayo de patrón de cisteína. Para estimar la eficiencia de acoplamiento del análogo al péptido de cisteína, se preparó una curva patrón usando concentraciones conocidas de cisteína. El ensayo se basó en la reacción de 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB o reactivo de Ellman) que reacciona con grupos sulfhidrilo a pH 8,0 para producir un cromóforo con absorción máxima a 412 nm. Se siguió el siguiente procedimiento:
- 10 a. Se preparó un tampón de DTNB disolviendo el contenido del vial del tampón de DTNB (comercialmente disponible de Sigma-Aldrich St. Louis, MO (n.º de catálogo D4179) en 10 ml de agua.
- b. Después se disolvió reactivo de DTNB (comercialmente disponible de Sigma-Aldrich St. Louis, MO (n.º de catálogo D8130)) en 5 ml del tampón de DTNB de la etapa a.
- 15 c. Inmediatamente antes de su uso, se preparó una disolución de cisteína disolviendo 32 mg de clorhidrato de L-cisteína monohidratado (comercialmente disponible de Sigma-Aldrich St. Louis, MO (n.º de catálogo C7880)) en 1 ml de agua. Se diluyó en serie la disolución resultante de clorhidrato de L-cisteína con agua para proporcionar disoluciones madre diluidas en el intervalo de 0,4-0,04 mg/ml. Las disoluciones madre diluidas se usaron inmediatamente.
- 20 d. A tubos de ensayo marcados con etiqueta se les añadieron 50 µl de las disoluciones madre diluidas. Se usó un tubo de ensayo que contenía 50 µl de agua como blanco.
- 25 e. Después, a cada tubo de ensayo se le añadieron 0,1 ml de agua, 0,75 ml de tampón de DTNB, pH 8,0, e inmediatamente 0,1 ml de disolución de reactivo de DTNB (1 mg/ml) para proporcionar una disolución de ensayo de patrón de cisteína final con un volumen de 1 ml.
- f. Se mezcló el contenido de cada tubo de ensayo.
- 30 g. Se determinó la absorbancia de cada disolución de ensayo de patrón de cisteína a 412 nm. Si la absorbancia estaba por encima de 1,4, se diluyeron las muestras y se repitió el ensayo.
- h. Se representó gráficamente la absorbancia a 412 nm frente a la concentración de cisteína (mg/ml) para proporcionar una curva patrón. Se usó la parte lineal de la curva patrón, con concentraciones de cisteína que oscilaban desde 2-20 µg/ml, para determinar hap-total y hap-libre.
- 35 2. Ensayo de hapteno. Nota: si las muestras generaron valores superiores al patrón de cisteína más alto en el ensayo de patrón de cisteína, se diluyeron las muestras y se repitió el ensayo.
- 40 a. A tubos de ensayo marcados con etiqueta de manera apropiada se les añadieron 50 µl de las siguientes disoluciones:
- (i) Tampón de DTNB (blanco)
- 45 (ii) Muestra de péptido diluida (hap-total, a partir de conjugación con KLH, de la etapa A4 del ejemplo 2)
- (iii) Hapteno-KLH (hap-libre, de la etapa A7 de conjugación con KLH del ejemplo 2)
- 50 (iv) Muestra de péptido diluida (hap-total, de la etapa B3 de conjugación con BSA del ejemplo 2)
- (v) hap-BSA (hap-libre, a partir de conjugación con BSA, etapa B6 del ejemplo 2)
- b. A cada tubo marcado con etiqueta de la etapa (a) se le añadieron 0,1 ml de agua, 0,75 ml de tampón de DTNB, pH 8,0, e inmediatamente 0,1 ml de disolución de reactivo de DTNB (1 mg/ml), para proporcionar una disolución de ensayo de hapteno final con un volumen de 1 ml.
- 55 c. Se mezcló el contenido de cada tubo.
- d. Se determinó la absorbancia de la disolución en cada tubo marcado con etiqueta a 412 nm. Si la absorbancia estaba por encima de 1,4, se diluyeron las muestras y se repitió el ensayo.
- 60 e. Después se determinó la concentración de hap-total a partir de la absorbancia medida usando la curva patrón obtenida tal como se describió anteriormente en la sección 1h. Se usó la absorbancia medida para el tubo (ii) y el tubo (iv) para determinar hap-total para KLH y BSA, respectivamente. Se usó la absorbancia medida para el tubo (iii) y el tubo (v) para determinar hap-libre para KLH y BSA, respectivamente. Después se calcularon la
- 65

concentración de péptido en la disolución sin diluir y la eficiencia de acoplamiento tal como se describe en cálculos.

3. Cálculos

Para estimar las concentraciones de péptido y la eficiencia de acoplamiento, se preparó una curva patrón usando concentraciones conocidas de cisteína tal como se describió anteriormente (ensayo de patrón de cisteína). En este cálculo, un mol de cisteína es equivalente a un mol de hapteno que contiene sulfhidrilo.

Se usaron las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de eficiencia de acoplamiento} = \{(\text{Hap}(\text{conjugado}) / \text{Hap}(\text{total})) \times 100 = [(\text{Hap}(\text{total}) - \text{Hap}(\text{libre})) / \text{Hap}(\text{total})] \times 100$$

$$\text{Hap}(\text{total}) = \text{péptido}(\text{total}) \mu\text{mol/ml}$$

$$\text{Hap}(\text{libre}) = \text{péptido}(\text{libre}) \mu\text{mol/ml}$$

$$\text{Hap}(\text{conjugado}) = \text{Hap}(\text{total}) - \text{Hap}(\text{libre})$$

(Véase, también, Sigma-Aldrich Technical Bulletin for Maleimide Activated BSA, KLH Conjugation Kit (n.º de catálogo MBK1)). Este mismo procedimiento general tal como se describe en los ejemplos 2A-D puede usarse para medir la eficiencia de la conjugación de otros análogos de SDMA a KLH y BSA.

Ejemplo 3: método para generar anticuerpos anti-SDMA

El protocolo de inmunización para generar los anticuerpos anti-SDMA se llevó a cabo según el siguiente protocolo. Se inmunizaron seis conejos de raza californiana con un conjugado de SDMA. Tres de los seis conejos se inmunizaron con SDMA conjugada con BSA (conejos n.º 155, 156 y 157) y los otros tres conejos se inmunizaron con SDMA conjugada con KLH (conejos n.º 152, 153 y 154) (preparados tal como se describe en el ejemplo 2). Para las inmunizaciones primarias, a cada conejo se le inyectaron con 0,5 mg del conjugado de SDMA en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) mezclada con 1 ml de adyuvante completo de Freund. Cada conejo recibió 20-30 inyecciones intradérmicas en su lomo afeitado. Cada conejo recibió un refuerzo con 0,25 mg de inmunógeno en 1 ml de PBS mezclado con un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund en las patas traseras. Las inyecciones de refuerzo se administraron cada mes tras la inyección primaria. Se extrajeron muestras de sangre de prueba de 5 ml de sangre de cada conejo 7-10 días tras cada refuerzo. Se extrajeron muestras de sangre de producción de 40 ml de cada conejo tras la tercera inyección de refuerzo, cuando el título de antiseros era mayor de aproximadamente 1:2000. El título de antisuero es la dilución de antisuero que genera la curva de calibración más inclinada para el ensayo.

Ejemplo 4: caracterización de anticuerpos anti-SDMA

Con el fin de evaluar la especificidad de los anticuerpos obtenidos mediante los procedimientos descritos en el ejemplo 3 anterior, se midió su reactividad frente a SDMA, ADMA, L-arginina y/o N-metilarginina en un ensayo ELISA competitivo (tabla 1).

Se disolvieron cada uno de ADMA-2HCl, SDMA-2HCl, acetato de N-metilarginina (Sigma, n.º de cat. M7033) o L-arginina (Sigma, n.º de cat. A5006) en PBS para preparar disoluciones madre a 1 mg/ml. A partir de estas disoluciones madre, se prepararon disoluciones de trabajo a 100 µg/ml, 10 µg/ml y 1 µg/ml en PBS.

Se añadieron secuencialmente 50 µl del conjugado de SDMA-HRP (tal como se describe en el ejemplo 5 a continuación), 50 µl de ADMA, SDMA, N-metilarginina o L-arginina (a concentraciones de desde 1-100 µg/ml tal como se describió anteriormente), y 50 µl de anticuerpo de conejo anti-SDMA en suero (título de 1:3000) a un pocillo individual en una placa de micropocillos de poliestireno de 96 pocillos, previamente recubierta con IgG de oveja anti-conejo (comercialmente disponible de Beacon Analytical Systems Inc. de Portland, ME). Tras un periodo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron los pocillos 4 veces con PBST (solución salina tamponada con fosfato, Tween al 0,05%).

Posteriormente se añadieron 100 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (comercialmente disponible de Promega Corporation de Madison, WI). Tras un periodo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 100 µl de disolución de parada (HCl 1 N) y se midió la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas BioTek ELX 808 (Winooski, VT). Se sometieron los datos a cuantificación usando software Softmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Se determinaron los valores de absorbancia obtenidos con 0 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml y 100 µg/ml de ADMA, SDMA, N-metilarginina o L-arginina, respectivamente, y se representaron gráficamente. Se dividió la concentración de

SDMA a la que el valor de absorbancia se redujo en un 50% (con respecto a la absorbancia máxima obtenida a 0 µg/ml de SDMA; es decir CI_{50}) entre cada una de las concentraciones de ADMA, N-metilarginina o L-arginina, respectivamente, a las que el valor de absorbancia se redujo en un 50% (CI_{50}). Se multiplicó el valor resultante por 100 para obtener el valor de “% de reactividad cruzada”. Cuando se observó una reducción de absorbancia de <50% a concentraciones de hasta, e incluyendo, 100 µg/ml, se indicó una reactividad cruzada de <1% (véase la tabla 1).

Tal como se muestra en la tabla 1, los 6 sueros anti-SDMA de conejo tenían reactividades cruzadas de <1% frente a ADMA, N-metilarginina o L-arginina, respectivamente.

Tabla 1

Conejo n.º 152 (1:5 K)		
	CI_{50}	% de reactividad cruzada
SDMA	1,10 µg/ml	100%
ADMA	> 100	< 1%
L-Arginina	> 100	< 1%
N-MMA	> 100	< 1%
Conejo n.º 153 (1:2,5 K)		
	CI_{50}	% de reactividad cruzada
SDMA	0,65 µg/ml	100%
ADMA	> 100	< 1%
L-Arginina	> 100	< 1%
N-MMA	> 100	< 1%
Conejo n.º 154 (1:25 K)		
	CI_{50}	% de reactividad cruzada
SDMA	0,49 µg/ml	100%
ADMA	> 100	< 1%
L-Arginina	> 100	< 1%
N-MMA	> 100	< 1%
Conejo n.º 155 (1:3 K)		
	CI_{50}	% de reactividad cruzada
SDMA	0,73 µg/ml	100%
ADMA	> 100	< 1%
L-Arginina	> 100	< 1%
N-MMA	79 µg/ml	< 1%
Conejo n.º 156 (1:20 K)		
	CI_{50}	% de reactividad cruzada
SDMA	1,3 µg/ml	100%
ADMA	> 100	< 1%
L-Arginina	> 100	< 1%
N-MMA	> 100	< 1%
Conejo n.º 157 (1:15 K)		
	CI_{50}	% de reactividad cruzada
SDMA	1,6 µg/ml	100%
ADMA	> 100	< 1%
L-Arginina	> 100	< 1%
N-MMA	> 100	< 1%

Un experimento similar al descrito en los ejemplos 1-4, pero en el que se usó ADMA en lugar de SDMA, también generó anticuerpos. Sin embargo, usar un conjugado de ADMA-proteína para generar anticuerpos produjo anticuerpos que no eran específicos para ADMA libre y no eran útiles en un ensayo para medir ADMA.

En otro experimento, usando sólo anticuerpo policlonal a partir del conejo n.º 154, se determinó la especificidad del anticuerpo con mayor rigurosidad mediante el método descrito anteriormente. Estos datos (véase la tabla 2) muestran que la especificidad para el anticuerpo del conejo n.º 154 es incluso mayor que la mostrada en la tabla 1, anteriormente.

Tabla 2

Especificidad (reactividad cruzada) del conejo n.º 154	
	Reactividad cruzada
SDMA	100%
ADMA	< 0,2%
Arginina	< 0,01%
LMMA	<1%

Ejemplo 5: inmunoensayo competitivo para detectar niveles de SDMA *in vivo*

Se proporcionaron muestras de suero por clínicas/laboratorios veterinarios de animales que se sometieron a una exploración física de rutina y un panel químico de rutina.

Se preparó un conjugado de SDMA-HRP según el siguiente procedimiento:

1. Se reconstituyó polvo liofilizado de peroxidasa del rábano activada por maleimida, >200 unidades/mg de proteína (comercialmente disponible de Sigma-Aldrich St. Louis, MO, n.º de producto P1709)) hasta 2-5 mg/ml en NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0. Se desaireó el tampón y se purgó con nitrógeno o argón antes de su uso y el agua usada para preparar el tampón estaba libre de metales pesados traza y otros agentes oxidantes. Se realizó el acoplamiento en un vial ámbar para proteger la reacción frente a la luz.

2. Se disolvió análogo de SDMA (3) en el mismo tampón tal como se usó en la etapa 1 para proporcionar una disolución con una concentración de 2-5 mg/ml. Generalmente se usaron 1-2 moles de peroxidasa por mol de compuesto de sulfhidrilo. El peso molecular de peroxidasa es de aproximadamente 40.000.

3. Se combinó la disolución de la etapa 1 con la disolución de la etapa 2 y se agitó suavemente la disolución resultante durante 3 horas a temperatura ambiente. Después se bloquearon los grupos maleimida sin reaccionar añadiendo 2-mercaptoetanol 1 M (comercialmente disponible de Sigma-Aldrich St. Louis, MO, n.º de catálogo M 6250)) para proporcionar una concentración final de 2-mercaptoetanol 0,0015 M y se agitó la disolución resultante durante aproximadamente 15 minutos.

4. Después se bloquearon los grupos sulfhidrilo sin reaccionar añadiendo N-etilmaleimida 0,3 M (comercialmente disponible de Sigma-Aldrich St. Louis, MO n.º de catálogo D 8654)) a la disolución de la etapa 3 para proporcionar una concentración final de N-etilmaleimida 0,003 M.

5. Después se sometió la disolución resultante del conjugado de SDMA-HRP a intercambio en PBS mediante cromatografía (usando el mismo procedimiento descrito anteriormente en el ejemplo para conjugar análogo de SDMA (3) a KLH y BSA activadas por maleimida) o diálisis en PBS (Spectra/Por3, MWCO 3500 Spectrum Labs, Rancho Dominguez, CA) según las instrucciones del fabricante. Después se liofilizó la disolución resultante.

Véanse, también, Lin, F. T., *et al.*, Biochemistry, 18(4), 690 (1979); Kitagawa, T., *et al.*, Chem. Pharm. Bull., 29(4), 1131 (1981); Duncan, R. J. S., *et al.*, Anal. Biochem., 132, 68 (1983); y Palmer, J. L., *et al.*, J. Biol. Chem., 238(7), 2393 (1963).

Se añadieron secuencialmente 50 µl del conjugado de SDMA-HRP, 50 µl de muestra de suero (o calibrador, SDMA 2 HCl, comercialmente disponible de Calbiochem de San Diego, CA), y 50 µl de anticuerpo de conejo anti-SDMA en suero (título de 1:3000) a un pocillo individual en una placa de micropocillos de poliestireno de 96 pocillos, previamente recubierta con IgG de oveja anti-conejo (comercialmente disponible de Beacon Analytical Systems Inc. de Portland, ME). Tras un periodo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron los pocillos 4 veces con PBST (solución salina tamponada con fosfato, Tween al 0,05%).

Posteriormente se añadieron 100 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (comercialmente disponible de Promega Corporation de Madison, WI). Tras un periodo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 100 µl de disolución de parada (HCl 1 N) y se midió la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas BioTek ELX 808 (Winooski, VT). Se sometieron los datos a cuantificación usando software Softmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se generó una curva de calibración haciendo pasar una serie de patrones de SDMA (por ejemplo, 0, 0,05 µg/ml, 0,15 µg/ml, 0,45 µg/ml y 1,35 µg/ml). Se cuantificaron las muestras desconocidas usando la curva de calibración. Los resultados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3

Especie	Estado	SDMA, µM
Canina	Sano	1,1
Canina	Sano	1,1

Canina	Sano	1,1
Canina	Sano	0,7
Canina	Sano	1,7
Canina	Sano	1,4
Canina	Sano	1,2
Canina	Sano	1,7
Canina	Sano	1,9
Canina	Enfermedad renal	13,3
Canina	Enfermedad renal	6,1
Canina	Enfermedad renal	2,8
Canina	Enfermedad renal	2,2
Canina	Enfermedad renal	3,5
Canina	Enfermedad renal	2,3
Canina	Enfermedad renal	1,8
Felina	Sano	2,7
Felina	Sano	2,9
Felina	Sano	3,0
Felina	Sano	2,7
Felina	Sano	2,5
Felina	Sano	2,2
Felina	Sano	2,1
Felina	Sano	1,9
Felina	Enfermedad renal	70,3
Felina	Enfermedad renal	6,0
Felina	Enfermedad renal	5,2
Felina	Enfermedad renal	3,9

En la tabla 3, el estado “enfermedad renal” indica que la muestra extraída del animal mostraba valores de creatinina y nitrógeno ureico en sangre (BUN) por encima del intervalo de referencia normal y el estado “sano” indica que la muestra extraída del animal mostraba valores de creatinina y nitrógeno ureico en sangre (BUN) normales (intervalo de referencia). Para animales caninos, el límite superior del intervalo de referencia normal era de 27 mg/dl para BUN y de 1,8 mg/dl para creatinina. Para animales felinos, el límite superior del intervalo de referencia normal era de 34 mg/dl para BUN y de 2,3 mg/dl para creatinina.

Los resultados en la tabla 3 muestran que los niveles de SDMA estaban elevados en perros y gatos con función renal comprometida. Por tanto, puede usarse SDMA como marcador para diagnosticar enfermedad renal en animales.

Ejemplo 6: análisis de la tasa de filtración glomerular canina con concentración de creatinina y concentración de SDMA libre.

Se extrajeron muestras de suero de perros hembra heterocigóticos (portadores) (n=20) con neuropatía hereditaria ligada al cromosoma X (XLHN). XLHN está provocada por una mutación en el gen *COL4A5*, que en los perros hembra provoca una expresión de tipo mosaico de péptidos de colágeno de tipo IV y aparición de proteinuria glomerular entre 3 y 6 meses de edad. (Nabity *et al.*, J Vet Intern Med 2007; 21:425-430). Se midieron las concentraciones de creatinina y SDMA en cada muestra.

Se midió la concentración de creatinina de las muestras usando tecnología de portaobjetos secos IDEXX tal como se describió anteriormente.

Se determinaron las concentraciones de SDMA libre de las muestras de la siguiente manera: Las fases móviles de CL-EM eran (A) 10 ml de ácido propiónico y 250 µl de ácido trifluoroacético en 1 l de agua; y (B) 10 ml de ácido propiónico y 250 µl de ácido trifluoroacético en 1 l de acetonitrilo. Se preparó un patrón interno de 2,5 ng/ml de dimetilarginina asimétrica deuteriada (d-ADMA) en agua. Se preparó la curva STD (patrón) en suero canino separado realizando adiciones conocidas de 20 µg/ml de disolución de SDMA, seguido por diluciones para obtener una curva STD de 9 puntos variando las concentraciones desde 1,56 µg/dl hasta 100 µg/dl. Para realizar las mediciones, se transfirieron 100 µl de la muestra que iba a medirse (es decir, una muestra de suero o una disolución de patrón) al interior de tubos de microcentrífuga. Se añadieron 10 µl de la disolución de patrón interno y 200 µl de fase móvil B a cada tubo. Se agitaron los tubos con vórtex para mezclar y se dejó que reposaran durante 30 min, después se centrifugaron a 13000g durante 20 minutos a 25°C. Se transfirieron los sobrenadantes al interior de viales de HPLC ámbar de 2 ml, y se analizaron las muestras mediante CL-EM. La CL-EM se realizó en dispositivos

de HPLC y API-4000 de ABSciex, que se hicieron funcionar con una exploración de tipo MRM, polaridad positiva, modo de exploración de turbopulverización, resolución Q1 = unidad y resolución Q3 = unidad. La columna era una columna 150x4,6 PVA SIL, el flujo era de 1 ml/min y el gradiente era isocrático a B:A 90:10. Los cromatogramas se ejecutaron durante 9 min a temperatura ambiental.

Se midió la GFR real de los animales mediante el método de aclaramiento de iohexol. Se inyectó iohexol a los sujetos.

Se extrajeron muestras de sangre a diversos intervalos de tiempo, y se midió el iohexol en suero mediante HPLC.

Se recogieron tres puntos de datos para cada perro. En la figura 5 se proporciona una representación gráfica logística de cuatro parámetros (4PL) de la concentración de creatinina (mg/dl) frente a GFR (ml/min/kg). El valor de R^2 para estos datos es de 0,94 con un error estándar de 0,12 a lo largo de un intervalo de concentración de 0,5-3,0 mg/dl, lo que representa aproximadamente el 5% del intervalo total.

La figura 6 muestra los resultados de la concentración de SDMA ($\mu\text{g/dl}$) frente a GFR (ml/min/kg). Un ajuste de 4PL para la relación SDMA-GFR proporciona un valor de R^2 de 0,95, con un error estándar de 1,7 a lo largo de un intervalo de 5-40 $\mu\text{g/dl}$ para SDMA. Este error representa aproximadamente el 5% del intervalo total.

La figura 7 muestra los resultados de combinar valores de creatinina y valores de SDMA usando una simple multiplicación de los valores, lo cual muestra una mejora para la relación con GFR con respecto a creatinina sola o SDMA sola. El ajuste de 4PL de la relación de $[\text{Creatinina}] \times [\text{SDMA}]$ -GFR proporciona un valor de R^2 de 0,98, con un error estándar de 2,8 a lo largo de un intervalo de 0-90 $\mu\text{g/dl}$ para $[\text{Creatinina}] \times [\text{SDMA}]$. Este error representa aproximadamente el 3% del intervalo total para la relación con GFR para estos perros.

La figura 8 muestra el análisis de $1/[\text{Creatinina}]^P \times 1/[\text{SDMA}]^Q$, usando un ajuste lineal. Usando una regresión lineal, P era de 0,37 y Q era de 0,43. La R^2 para la combinación proporcionó un valor de 0,87, en comparación con 0,83 para $1/[\text{Creatinina}]$ solo y 0,85 para $1/[\text{SDMA}]$ solo.

Ejemplo 7: análisis de la tasa de filtración glomerular felina con la concentración de creatinina y la concentración de SDMA libre.

Se usaron diez gatos hembra con de 1 a 4 puntos de datos cada uno para evaluar si la combinación multiplicativa de valores de SDMA y creatinina estaba mejor correlacionada con GFR que los valores de marcadores individuales solos. Se midieron SDMA, creatinina y GFR tal como se describió anteriormente.

La figura 9 muestra los resultados de la concentración de SDMA ($\mu\text{g/dl}$) frente a GFR (ml/min/kg). Un ajuste de 4PL para la relación de SDMA-GFR proporciona un valor de R^2 de 0,73, con un error estándar de 2,3 a lo largo de un intervalo de 15 $\mu\text{g/dl}$ para SDMA. Este error representa aproximadamente el 15% del intervalo total.

La figura 10 muestra los resultados de la concentración de creatinina (mg/dl) frente a GFR (ml/min/kg). Un ajuste de 4PL para la relación de creatinina-GFR proporciona un valor de R^2 de 0,82, con un error estándar de 0,15 a lo largo de un intervalo de 1,5 mg/dl. Este error representa aproximadamente el 10% del intervalo total.

La figura 11 muestra los resultados de combinar valores de creatinina y valores de SDMA usando una simple multiplicación de los valores, lo cual muestra una mejora para la relación con GFR con respecto a creatinina sola o SDMA sola. El ajuste de 4PL de la relación de $[\text{Creatinina}] \times [\text{SDMA}]$ -GFR proporciona un valor de R^2 de 0,89, con un error estándar de 3,9 a lo largo de un intervalo de 40 $\mu\text{g/dl}$ $[\text{Creatinina}] \times [\text{SDMA}]$. Este error representa aproximadamente el 10% del intervalo total.

La figura 12 muestra el análisis de $1/[\text{Creatinina}]^P \times 1/[\text{SDMA}]^Q$, usando un ajuste lineal. Usando una regresión lineal, P era de 1,2 y Q era de 0,95. La R^2 para la combinación proporcionó un valor de 0,95, en comparación con 0,44 para $1/[\text{Creatinina}]$ solo y 0,65 para $1/[\text{SDMA}]$ solo.

Ejemplo 8: mejora de la sensibilidad y/o especificidad en el diagnóstico de enfermedad renal mediante una combinación de valores de corte de CRE y SDMA (ejemplo de referencia que no forma parte de la presente invención).

Se determinó el estado de enfermedad renal de 113 gatos y se estadificó según el algoritmo para la estadificación de enfermedad renal crónica (CKD) en perros y gatos tal como se proporciona por la Sociedad internacional de interés renal (IRIS). Para cada gato, se analizaron de 1 a 6 muestras de suero extraídas en diversos puntos de tiempo para determinar la creatinina [CRE] y/o SDMA. 194 muestras procedían de 61 gatos normales (es decir, sin CKD). 182 muestras procedían de 55 gatos que padecían CKD.

En este ejemplo, se determinaron valores de corte para SDMA y CRE y se usaron para determinar CKD. El valor de

corte representa la concentración en suero umbral por encima de la cual se diagnostica que el individuo tiene enfermedad renal para esta prueba particular. $SDMA_{CORTE}$ es el valor de corte para SDMA. $[SDMA]$ y $SDMA_{CORTE}$ se miden en $\mu g/dl$ (microgramos/decilitro). Por ejemplo, $SDMA_{CORTE}$ puede ser de aproximadamente 14 $\mu g/dl$, o entre aproximadamente 10 y 20 $\mu g/dl$.

CRE_{CORTE} es el valor de corte para CRE. CRE y CRE_{CORTE} se miden en mg/dl. Por ejemplo, CRE_{CORTE} puede ser de aproximadamente 2,0 mg/dl a 2,4 mg/dl, o entre aproximadamente 1,7 y 2,8 mg/dl.

Para SDMA sola, se estableció un valor de corte ($SDMA_{CORTE}$) a 14 $\mu g/dl$. Usando este valor, había una tasa de falsos positivos del 10,3% para gatos normales, y una tasa de falsos negativos del 26,9% para gatos con CKD (véase la tabla 4).

Tabla 4

	% de falsos positivos	N.º de falsos positivos	% de falsos negativos	N.º de falsos negativos	% de diagnósticos positivos	N.º total
Normal	10,3	20			89,7	194
KD			26,9	49	73,1	182

Para creatinina sola, se estableció un valor de corte (CRE_{CORTE}) a 2,4 mg/dl. Usando este valor, había una tasa de falsos positivos del 0,0% para gatos normales, y una tasa de falsos negativos del 43,4% para gatos con CKD (véase la tabla 5).

Tabla 5

	% de falsos positivos	N.º de falsos positivos	% de falsos negativos	N.º de falsos negativos	% de diagnósticos positivos	N.º total
Normal	0,0	0			100,0	194
KD			43,4	79	56,6	182

C_{CORTE} es el valor de corte para el valor de combinación C. Se combinaron los valores de creatinina y SDMA según la fórmula:

$$\text{Valor de combinación C} = [SDMA] / SDMA_{CORTE} + [CRE] / CRE_{CORTE}.$$

C_{CORTE} no tiene una unidad de medición. Por ejemplo, C_{CORTE} puede ser de 1,5, 1,7 ó 2,0, o entre 1,3 y 2,5.

Cuando se estableció C_{CORTE} a 1,5, había una tasa de falsos positivos del 12,4% para gatos normales, y una tasa de falsos negativos del 1,6% para gatos con CKD (véase la tabla 6). Cuando se estableció C_{CORTE} a 1,7, había una tasa de falsos positivos del 3,5% para gatos normales, y una tasa de falsos negativos del 14,3% para gatos con CKD (véase la tabla 7). Cuando se estableció C_{CORTE} a 2,0, había una tasa de falsos positivos del 3,5% para gatos normales, y una tasa de falsos negativos del 33,5% para gatos con CKD (véase la tabla 8).

Tabla 6

	% de falsos positivos	N.º de falsos positivos	% de falsos negativos	N.º de falsos negativos	% de diagnósticos positivos	N.º total
Normal	12,4	25			87,6	194
KD			1,6	3	98,4	182

Tabla 7

	% de falsos positivos	N.º de falsos positivos	% de falsos negativos	N.º de falsos negativos	% de diagnósticos positivos	N.º total
Normal	3,5	7			96,5	194
KD			14,3	26	85,7	182

Tabla 8

	% de falsos positivos	N.º de falsos positivos	% de falsos negativos	N.º de falsos negativos	% de diagnósticos positivos	N.º total
Normal	3,5	7			96,5	194
KD			33,5	61	66,5	182

Se representó gráficamente la sensibilidad y especificidad estimadas del valor de combinación frente a C_{CORTE} para

determinar valores adecuados para C_{CORTE} (véase la figura 13). Si C es mayor que ($>$) C_{CORTE} , se diagnostica que el individuo tiene enfermedad renal. Por consiguiente, combinar valores de SDMA y CRE basándose en sus valores de corte de diagnóstico respectivos conduce a una mejora de la sensibilidad y/o especificidad de detección de enfermedad renal en animales.

Ejemplo 9: determinación de la razón de creatinina con respecto a SDMA en animales sanos y enfermos.

En animales sanos, la razón de la concentración de SDMA ($\mu\text{g/dl}$) y creatinina (mg/dl) oscila generalmente desde aproximadamente 4:1 hasta 10:1 ($\mu\text{g/dl}:\text{mg/dl}$). En algunos pacientes con enfermedad renal crónica, esta razón supera 10:1, lo cual puede indicar la progresión de enfermedad.

En este estudio, se observó una tendencia longitudinal de SDMA y creatinina en perros con CKD. Se incluyeron veinticuatro perros con CKD en el estudio basándose en los siguientes criterios: edad (9,4-18,3 años); con azotemia persistente (> 3 meses); GFR; exploración física; creatinina en suero, y análisis de orina.

Se mantuvieron todos los perros con calidad de asistencia incluyendo nutrición óptima, atención veterinaria y ejercicio diario. Tras el diagnóstico de CKD, se alimentaron los perros con pienso para perros PRESCRIPTION DIET® k/d® (Hill's Pet Nutrition, Inc., Topeka, Kansas).

Se extrajeron muestras de estos perros de manera regular (2-3 veces al año). Se congelaron las muestras y se almacenaron en un banco, se midió la creatinina mediante colorimetría enzimática usando el analizador COBAS®. Se midió la SDMA mediante CL-EM tal como se describió anteriormente con la excepción de que se precipitaron muestras de suero con acetonitrilo, y de que se usó una columna Waters XBridge C18 5 μm 4,6*30. La fase móvil A consistía en ácido perfluoroheptanoico 0,5 mM en ácido fórmico al 0,1% en agua y la fase móvil B es ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo con un gradiente del 100% de B al 100% de A con un tiempo de ejecución de 4 minutos. En la figura 14 se muestra la correlación entre SDMA ($\mu\text{g/dl}$) y creatinina (mg/dl).

Ejemplo 10: discordancia entre valores de SDMA y creatinina en algunos gatos con CKD (ejemplo de referencia)

La discordancia en la razón de SDMA:creatinina puede ser predictiva de mortalidad en animales. Por ejemplo, en gatos con CKD, los valores de SDMA observados eran altos con respecto a las concentraciones esperadas basándose en valores de creatinina correspondientes. Tal como se muestra en la figura 14, hay una fuerte correlación entre SDMA y creatinina, y la razón normal es de menos de 10 ($\mu\text{g/dl}:\text{mg/dl}$). En este estudio, se determinó la razón en 26 gatos con CKD. A estos 26 gatos se les había diagnosticado CKD basándose en exploración física, creatinina en suero y análisis de orina. Tal como se muestra en la figura 15, dos de los 26 gatos tenían una razón de SDMA:creatinina de más de 10 y habían muerto en el momento del seguimiento, aunque no se documentó si estos gatos se habían sacrificado o habían sucumbido a la enfermedad.

Ejemplo 11: razón de SDMA:creatinina en la predicción de mortalidad en gatos con CKD (ejemplo de referencia)

En este estudio, se observó una tendencia longitudinal de SDMA y creatinina en gatos con CKD. Se incluyeron dieciocho gatos con CKD en el estudio basándose en los siguientes criterios: azotemia persistente durante al menos 3 meses; o sin azotemia con una reducción de $>30\%$ de la GFR con respecto a la mediana de GFR de gatos normales; o cálculos renales de oxalato de calcio.

Se mantuvieron todos los gatos con calidad de asistencia incluyendo nutrición óptima, atención veterinaria y ejercicio diario, y oportunidades regulares de enriquecimiento con el entorno y del comportamiento. Tras el diagnóstico de CKD, se alimentaron los gatos con pienso PRESCRIPTION DIET® c/d® (Hill's Pet Nutrition, Inc., Topeka, Kansas).

Se extrajeron muestras de sangre y orina de estos gatos en diversos momentos, se congelaron y se almacenaron en banco. Se midió la creatinina mediante colorimetría enzimática usando el analizador COBAS®. Se midió la SDMA mediante CL-EM tal como se describió anteriormente.

En el momento en el que la concentración de SDMA alcanzó o superó por primera vez 14 $\mu\text{g/dl}$ en cada uno de los 18 gatos, 12 gatos tenían una razón de SDMA:creatinina de más de 10:1, y 6 gatos tenían una razón de SDMA:creatinina que era de 10:1 o menor. Para cada gato, se observó el tiempo desde la fecha en la que la concentración de SDMA alcanzó o superó por primera vez 14 $\mu\text{g/dl}$ hasta la fecha de la muerte, con la excepción de dos gatos. Estos dos gatos todavía estaban vivos al finalizar el estudio; por tanto, la fecha de la muerte se sustituyó por la fecha de fin del estudio para estos dos gatos.

Los 12 gatos que tenían una razón de SDMA:creatinina de más de 10:1 tenían una mediana del tiempo de supervivencia de 13,9 meses (media = 18,7; intervalo = 1,8-47,4). Los 6 gatos que tenían una razón de SDMA:creatinina de 10:1 o menos tenían una mediana del tiempo de supervivencia de 18,7 meses (media = 18,9; intervalo = 8,7-28,7). Por tanto, los gatos que tenían una razón de SDMA:creatinina de más de 10:1 tenían una

mortalidad mayor que los gatos que tenían una razón de SDMA:creatinina de 10:1. Las figuras 16, 17 y 18 muestran el transcurso temporal de las razones de SDMA:creatinina para tres gatos del estudio, con razones de SDMA:creatinina que superaban 10 (gato n.º 13, gato n.º 8 y gato n.º 14), a lo largo del transcurso de varios años. El gato n.º 13 murió a los 27,2 meses, el gato n.º 8 murió a los 29,4 meses, y el gato n.º 14 murió a los 12,3 meses, después de la fecha en la que la concentración de SDMA en suero alcanzó por primera vez al menos 14 µg/dl. En la última medición en la autopsia, las razones para los tres gatos oscilaban desde aproximadamente 17 hasta 34.

Ejemplo 12: predicción de la mortalidad usando SDMA y creatinina (ejemplo de referencia que no forma parte de la presente invención).

Las figuras 19 y 20 muestran una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para gatos (a partir del estudio descrito en el ejemplo 11) y perros (a partir del estudio descrito en el ejemplo 9) usando un valor de corte de SDMA de 14 µg/dl. La figura 19 muestra que los gatos que tenían una concentración de SDMA en suero de al menos 14 µg/dl tenían un tiempo de supervivencia reducido y una probabilidad aumentada de mortalidad. Los gatos con SDMA en suero de menos de 14 µg/dl sobrevivieron aproximadamente 1,6 veces más tiempo que los gatos que tenían SDMA en suero igual o superior a 14 µg/dl. En este estudio, la creatinina no logró predecir la mortalidad en gatos (punto de corte de referencia de 2,1 mg/dl).

La figura 20 muestra una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para perros que tienen una concentración de SDMA en suero de más o menos de 14 µg/dl. En este estudio, los perros con SDMA <14 µg/dl sobrevivieron 2,6 veces más tiempo en comparación con perros con SDMA ≥14 µg/dl. La creatinina no logró predecir la mortalidad (punto de corte de referencia de 1,5 mg/dl).

Los ejemplos facilitados anteriormente son simplemente ilustrativos y no se pretende que sean una lista exhaustiva de todas las posibles realizaciones, aplicaciones o modificaciones de la invención. Por tanto, diversas modificaciones y variaciones de los métodos y sistemas descritos usados en la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica sin alejarse del alcance de la invención.

También debe observarse que, tal como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una”, y “el/la” incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, una referencia a “un grupo de unión” es una referencia a uno o más grupos de unión y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que se refiere la invención. Las realizaciones de la invención y las diversas características y detalles ventajosos de las mismas se explican más completamente con referencia a las realizaciones y/o se ilustran en los dibujos adjuntos y se detallan en la siguiente descripción. Debe observarse que las características ilustradas en los dibujos no están necesariamente dibujadas a escala, y pueden emplearse características de una realización con otras realizaciones tal como reconocerá el experto en la técnica, aunque no se mencione explícitamente en el presente documento.

Cualquier valor numérico mencionado en el presente documento incluye todos los valores desde el valor inferior hasta el valor superior en incrementos de una unidad siempre que haya una separación de al menos dos unidades entre cualquier valor inferior y cualquier valor superior. Como ejemplo, si se menciona que la concentración de un componente o el valor de una variable de procedimiento tal como, por ejemplo, tamaño, tamaño de ángulo, presión, tiempo y similares, es, por ejemplo, de desde 1 hasta 90, específicamente desde 20 hasta 80, más específicamente desde 30 hasta 70, se pretende que se indiquen expresamente valores tales como de 15 a 85, de 22 a 68, de 43 a 51, de 30 a 32, etc. en esta memoria descriptiva. Para valores que son inferiores a uno, se considera que una unidad es 0,0001, 0,001, 0,01 ó 0,1 según sea apropiado. Estos sólo son ejemplos de lo que se pretende específicamente y debe considerarse que todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto indicados se mencionan expresamente en esta solicitud de una manera similar.

Se describen métodos, dispositivos y materiales particulares, aunque puede usarse cualquier método y material similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o pruebas de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Método para estimar la tasa de filtración glomerular (GFR) en un sujeto animal, comprendiendo el método:
5 medir la concentración de dimetilarginina simétrica libre (SDMA) en una muestra de sangre del sujeto;
medir la concentración de creatinina en una muestra de sangre del sujeto; y
10 comparar un valor resultante de una ecuación que comprende el producto de la concentración de creatinina y la concentración de SDMA libre con uno o más valores convencionales que se correlacionan con la tasa de filtración glomerular en el sujeto animal.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la ecuación comprende la inversa del producto de la
15 concentración de creatinina y la concentración de SDMA libre.
3. Método según la reivindicación 1, en el que al menos una de la concentración de creatinina y la
concentración de SDMA libre se ponderan en el cálculo.
4. Método según la reivindicación 3, en el que el producto de un primer valor ponderado basado en la
20 concentración de creatinina y un segundo valor ponderado basado en la concentración de SDMA libre se
representa mediante la fórmula $PROD = [CRE]^P \times [SDMA]^Q$ en el que PROD es el producto, [CRE] es la
concentración de creatinina, [SDMA] es la concentración de SDMA, P proporciona el peso que va a darse a
[CRE] en la fórmula, y Q proporciona el peso que va a darse a [SDMA] en la fórmula.
- 25 5. Método según la reivindicación 4, en el que el uno o más valores convencionales se correlacionan con la
inversa del producto.
6. Método según la reivindicación 4, en el que P es de entre aproximadamente -5 y 0, pero sin incluir 0.
- 30 7. Método según la reivindicación 4, en el que Q es de entre aproximadamente -2,5 y 0, pero sin incluir 0.
8. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además determinar la función renal,
enfermedad renal o disfunción renal comparando la GFR en el sujeto con la GFR en uno o más sujetos
35 sanos.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la medición de la concentración de
SDMA libre comprende:
40 poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-SDMA conjugado a un marcador y con un análogo de
SDMA; en el que el anticuerpo anti-SDMA es específico para SDMA libre y no tiene ninguna o
sustancialmente ninguna reactividad cruzada con uno o más compuestos seleccionados del grupo que
consiste en dimetilarginina asimétrica (ADMA), L-arginina, y N-metilarginina y
45 detectar la presencia o cantidad del marcador asociado con el análogo de SDMA, determinando así la
presencia o cantidad de SDMA en la muestra.
10. Método según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo anti-SDMA tiene una reactividad para ADMA de
50 - menos del 25% de su reactividad para SDMA,
- menos del 10% de su reactividad para SDMA,
- menos del 5% de su reactividad para SDMA, o
55 - menos del 1% de su reactividad para SDMA.

FIG. 1

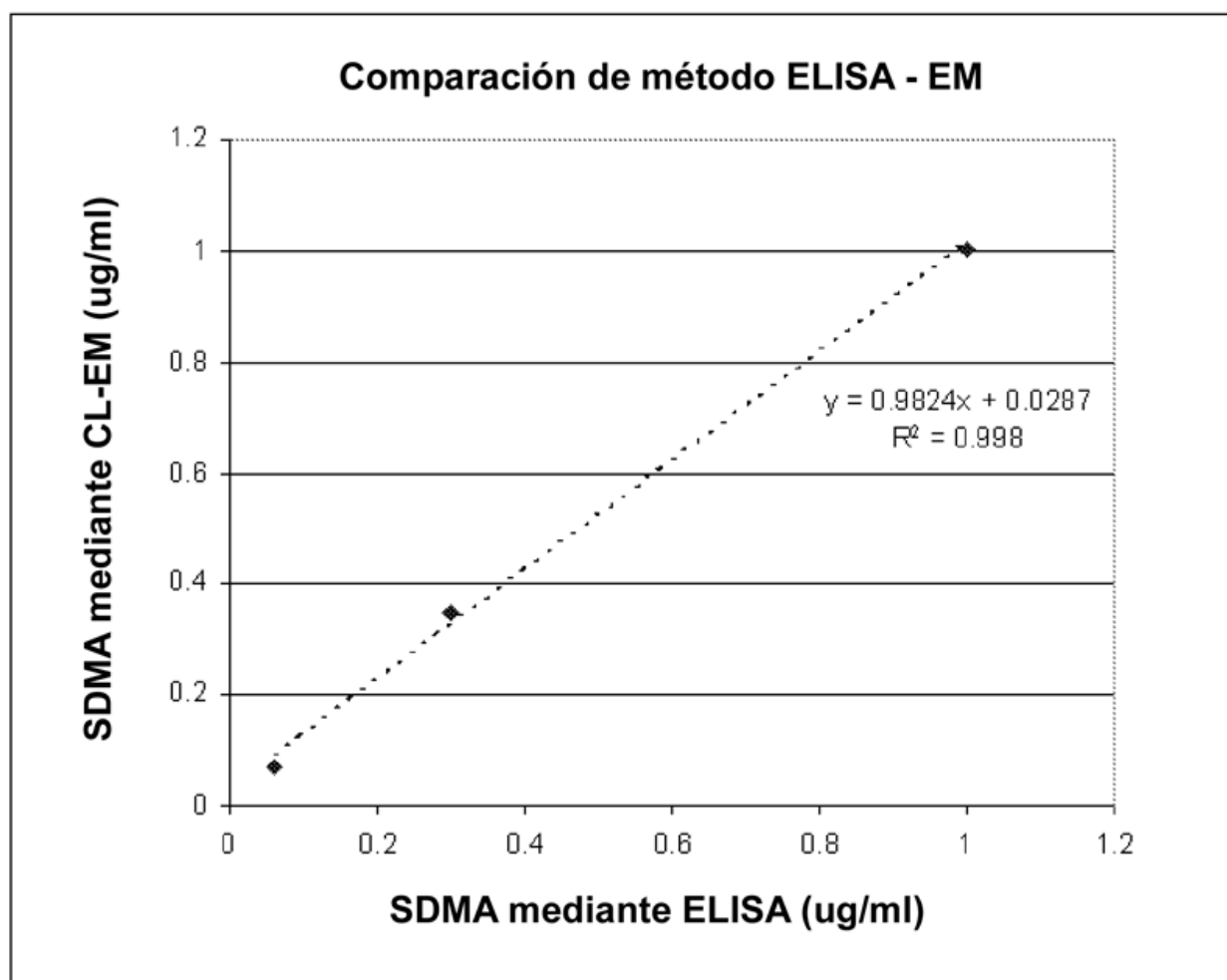


FIG. 2

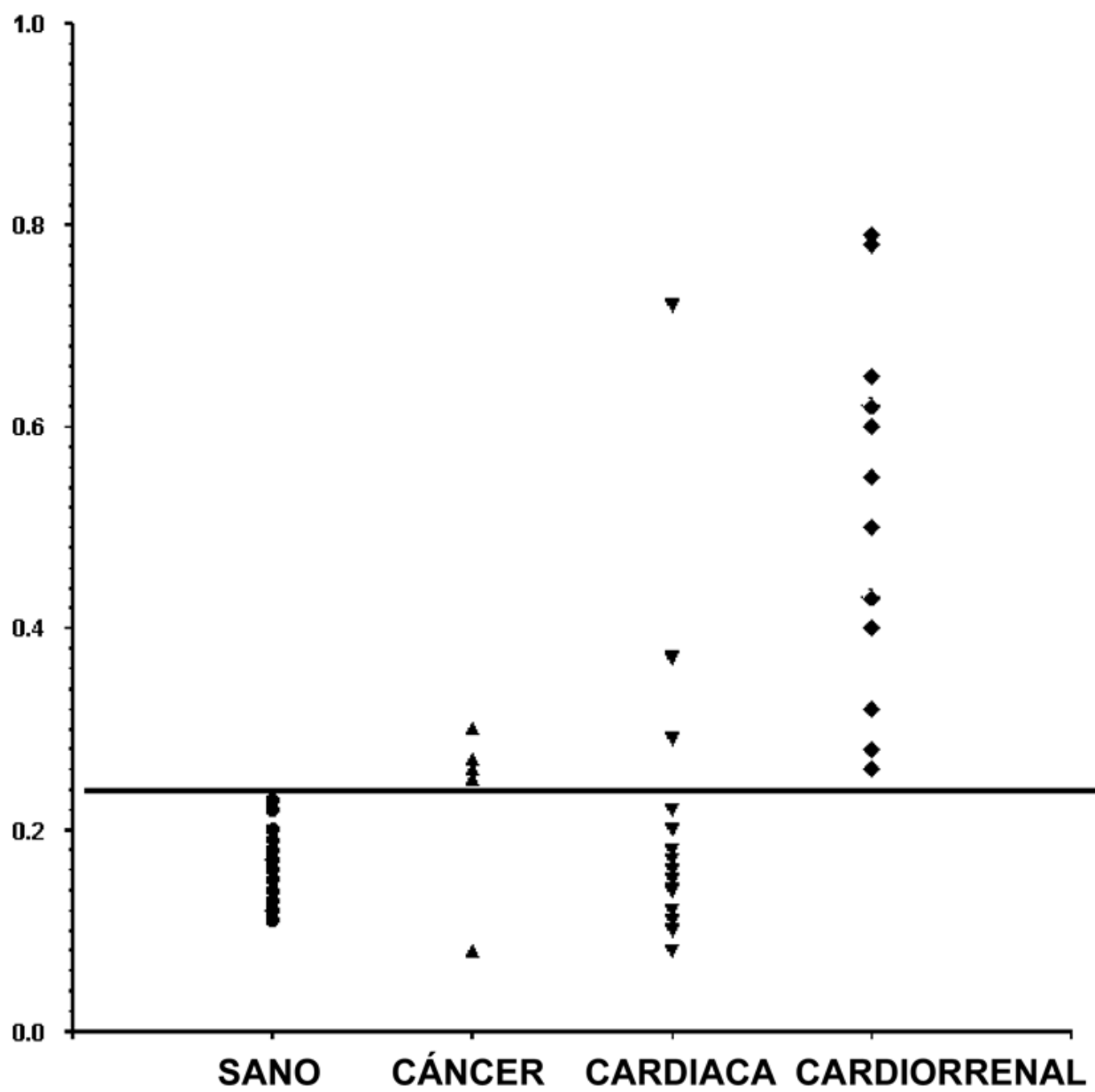


FIG. 3

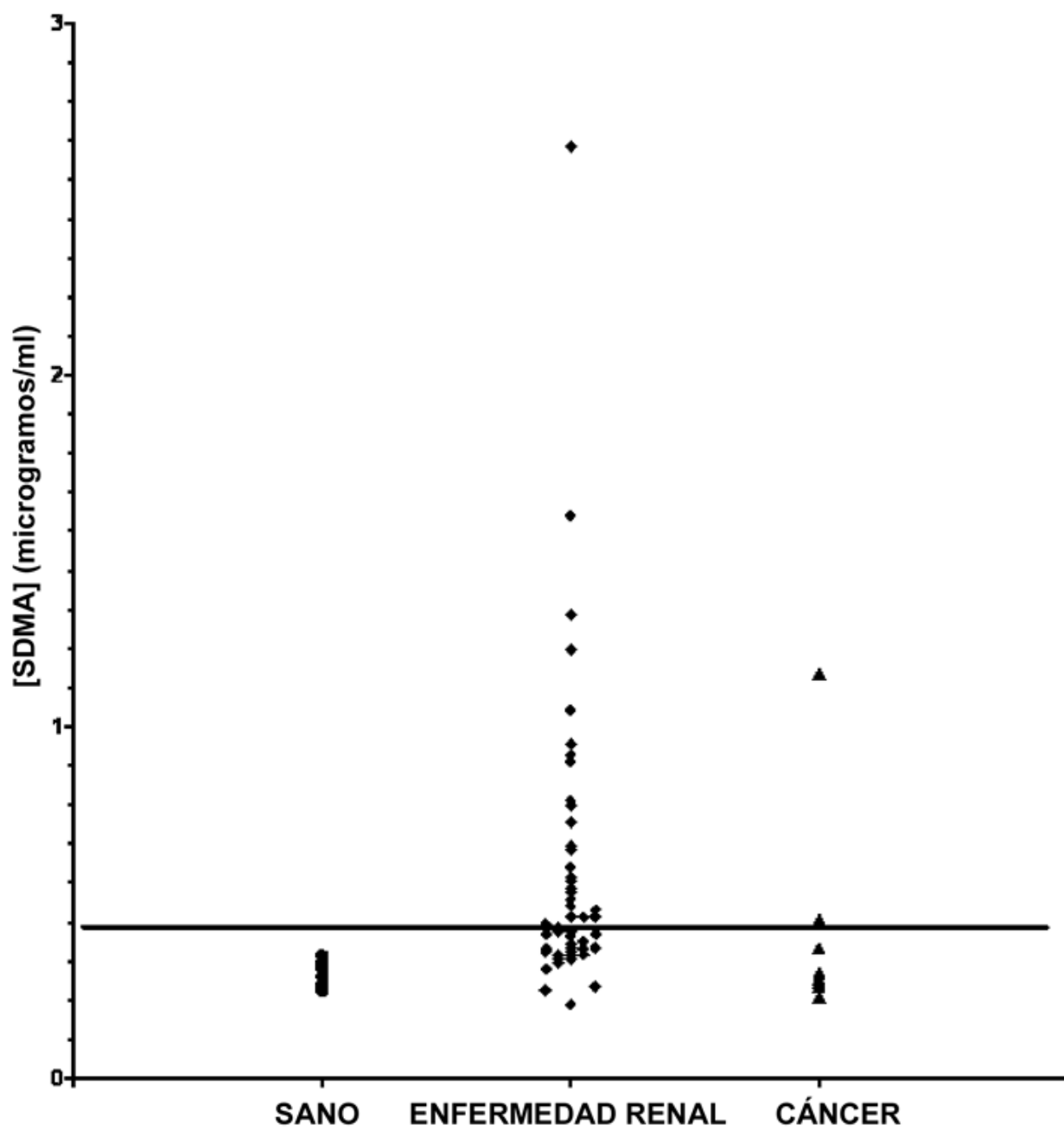


FIG. 4

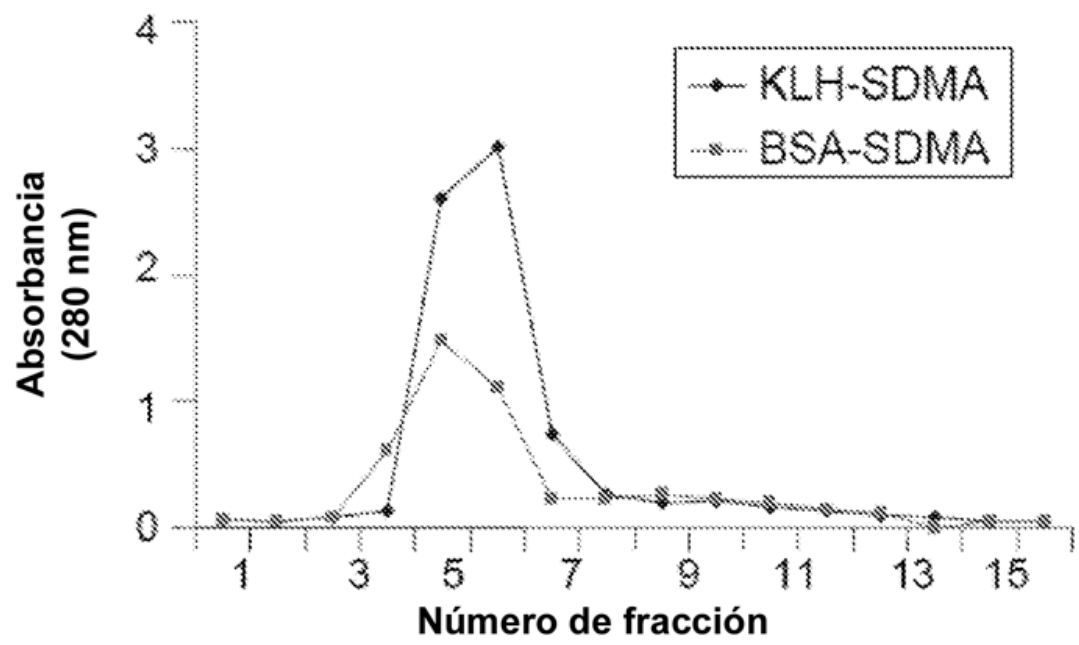


FIG. 5

Curva de ajuste**Comparación de modelos**

Modelo	AICc	BIC	SSE	MSE	RMSE	R cuadrado
4P logística	-108.352	-97.40181	0.9908565	0.01339	0.115715	0.9430009

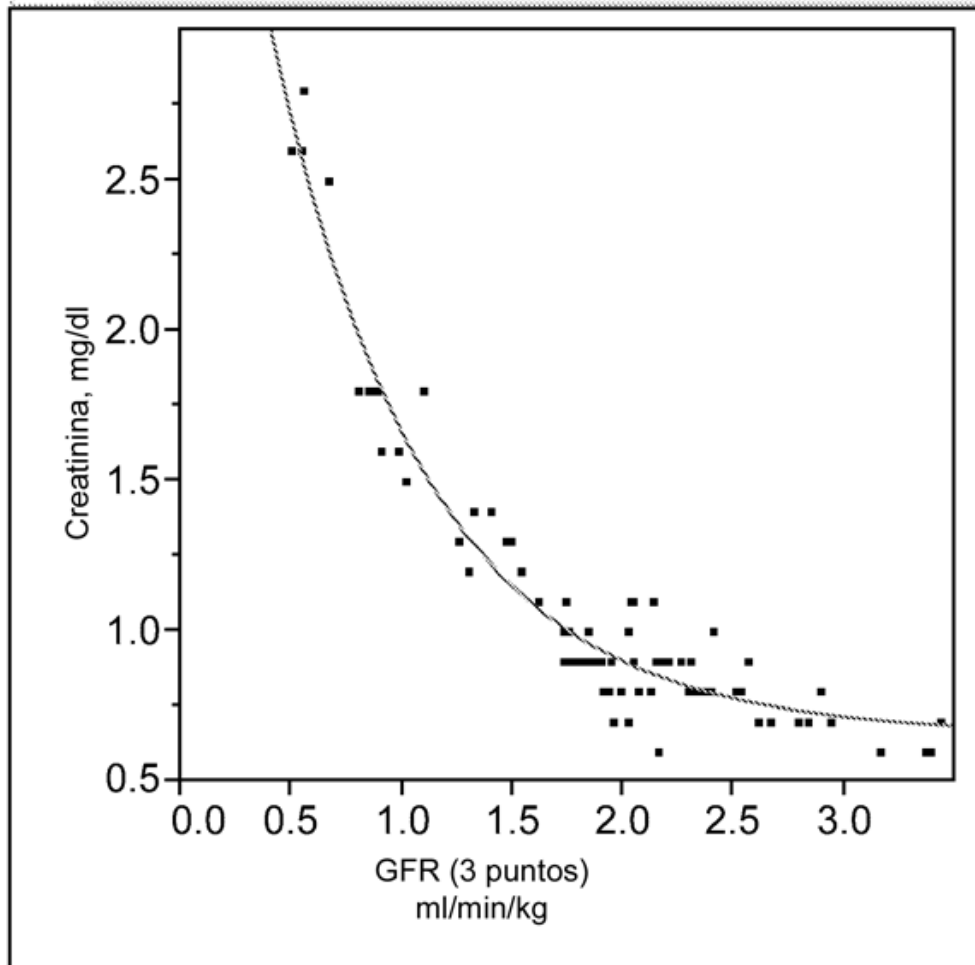
Representación gráfica

FIG. 6

Curva de ajuste**Comparación de modelos**

Modelo	AICc	BIC	SSE	MSE	RMSE	R cuadrado
4P logística	307.81111	318.76132	205.66305	2.7792304	1.6671024	0.951018

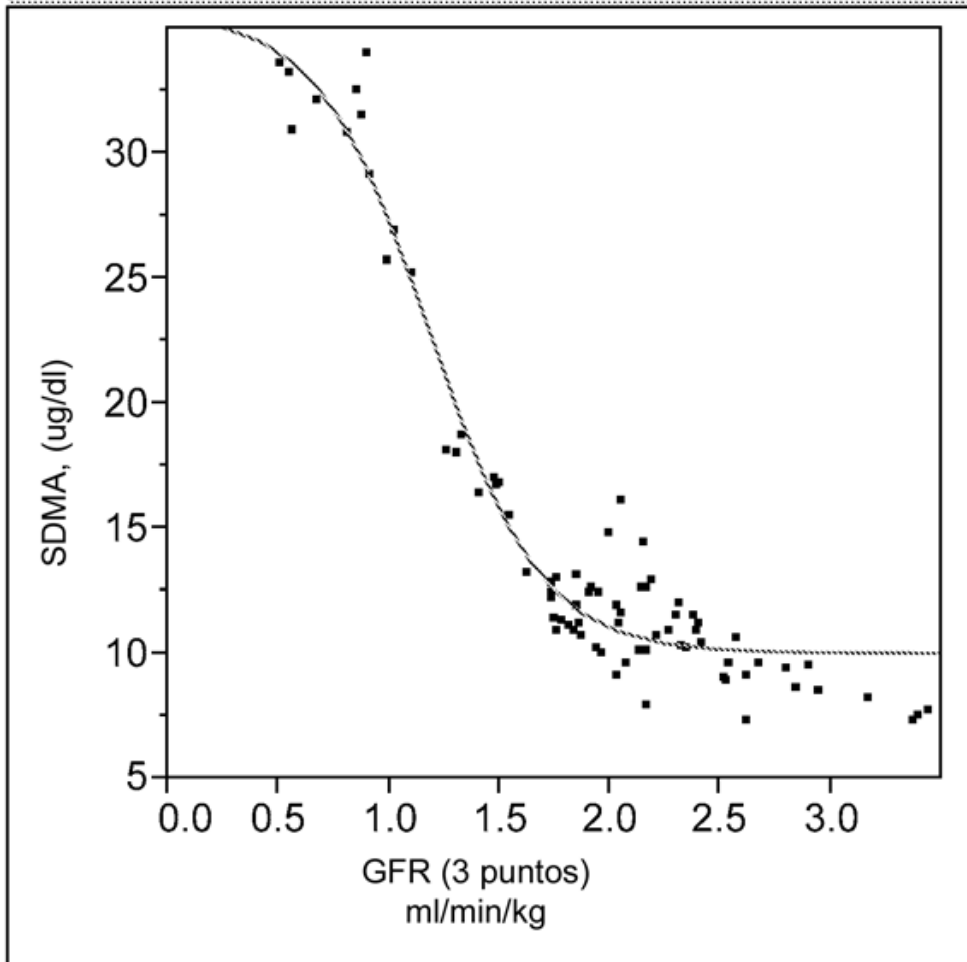
Representación gráfica

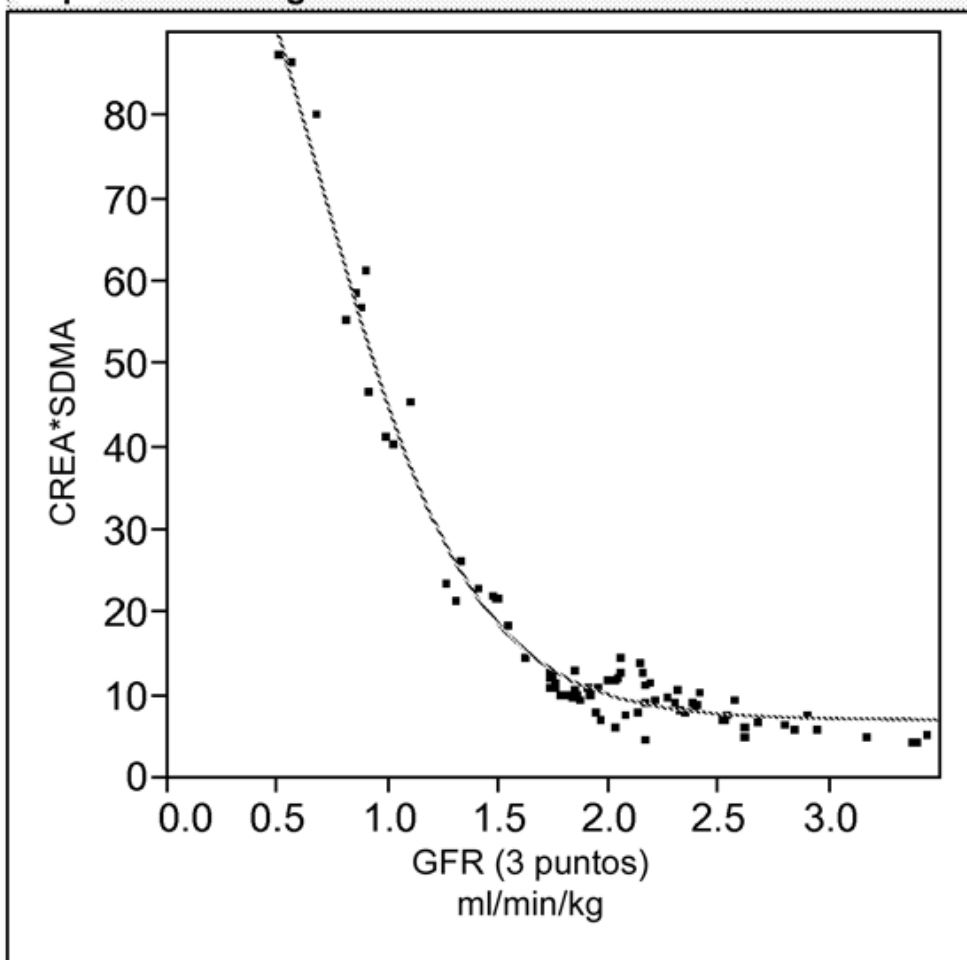
FIG. 7

Curva de ajuste

Comparación de modelos

Modelo	AICc	BIC	SSE	MSE	RMSE	R cuadrado
4P logística	388.7187	399.66891	580.28305	7.8416628	2.8002969	0.9818894

Representación gráfica



Ajuste de Y por grupo de X

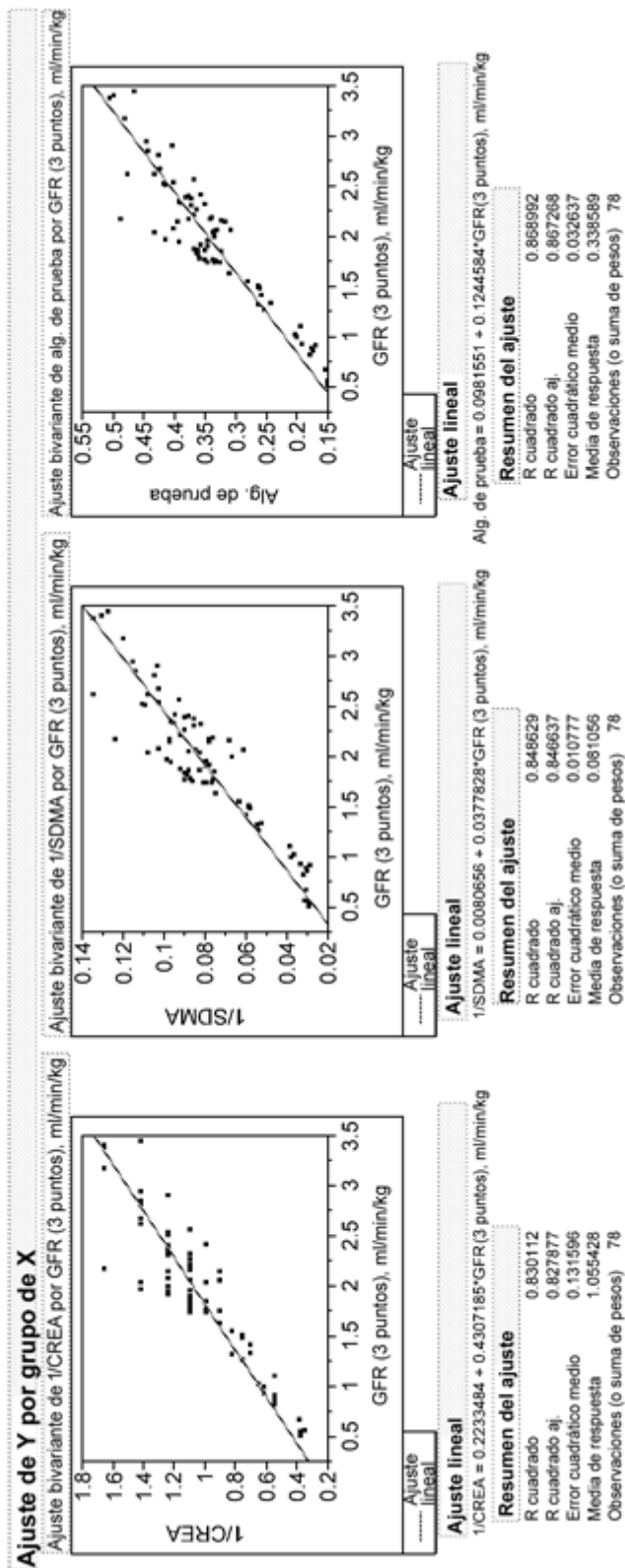
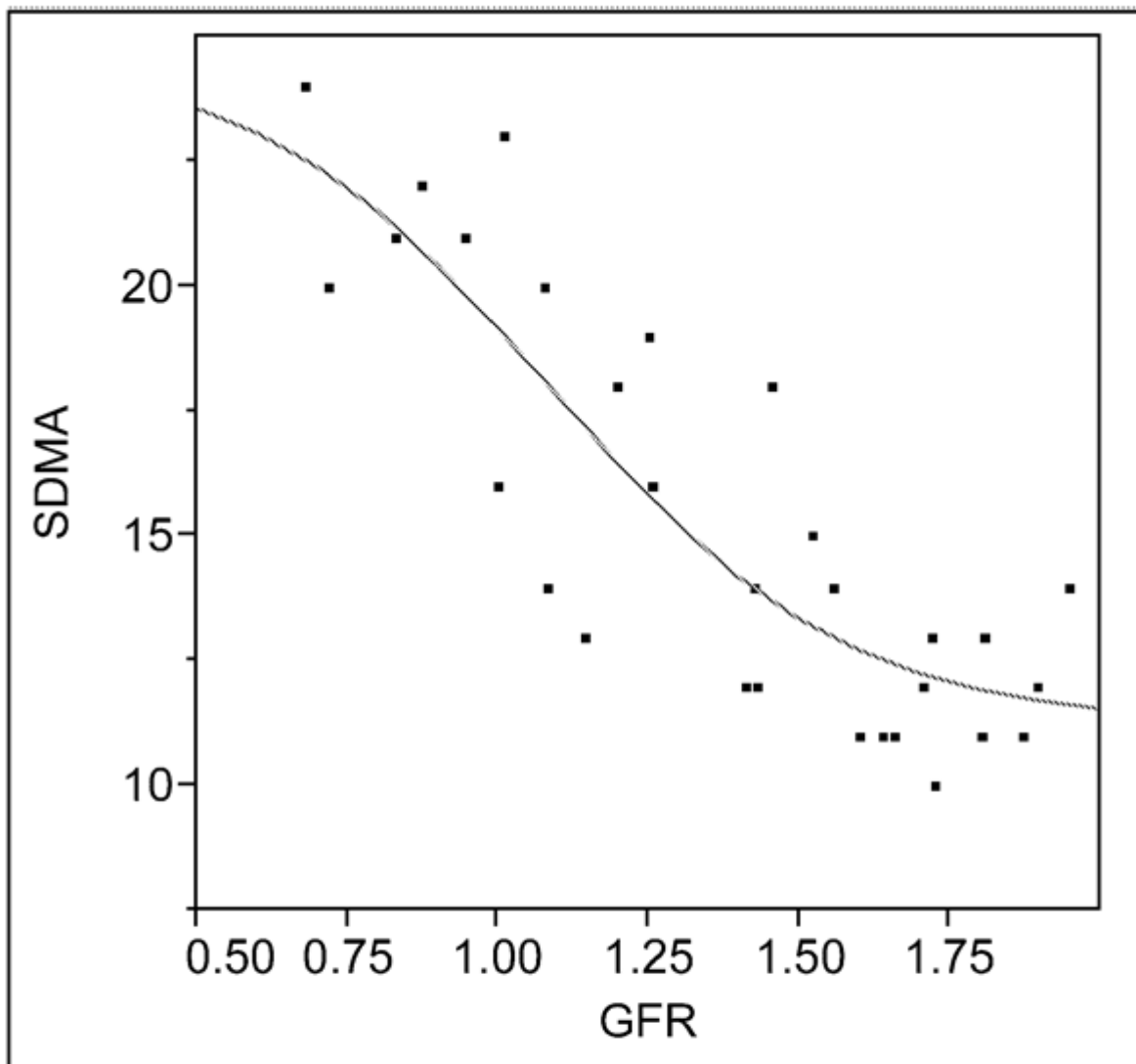
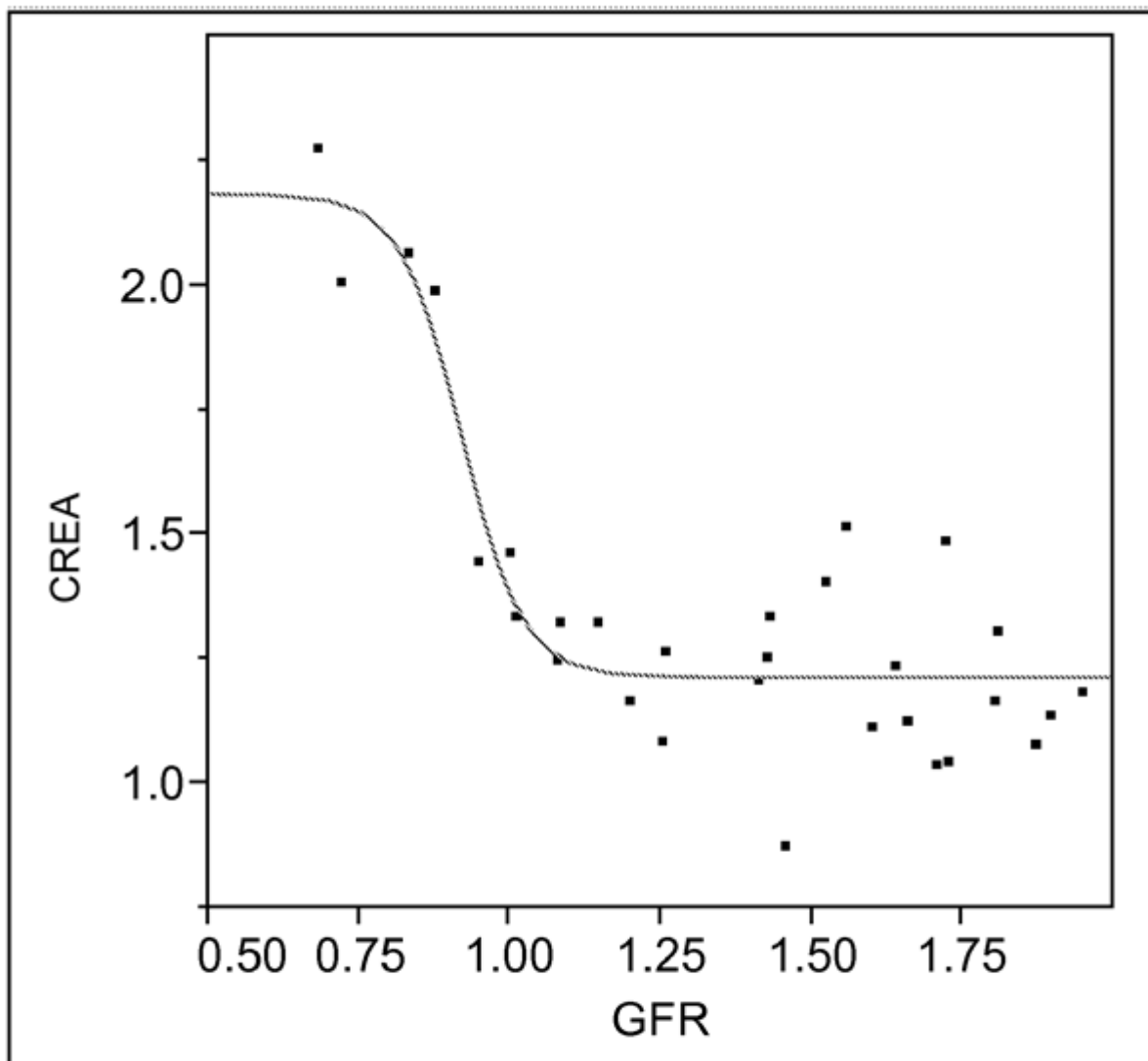


FIG. 9

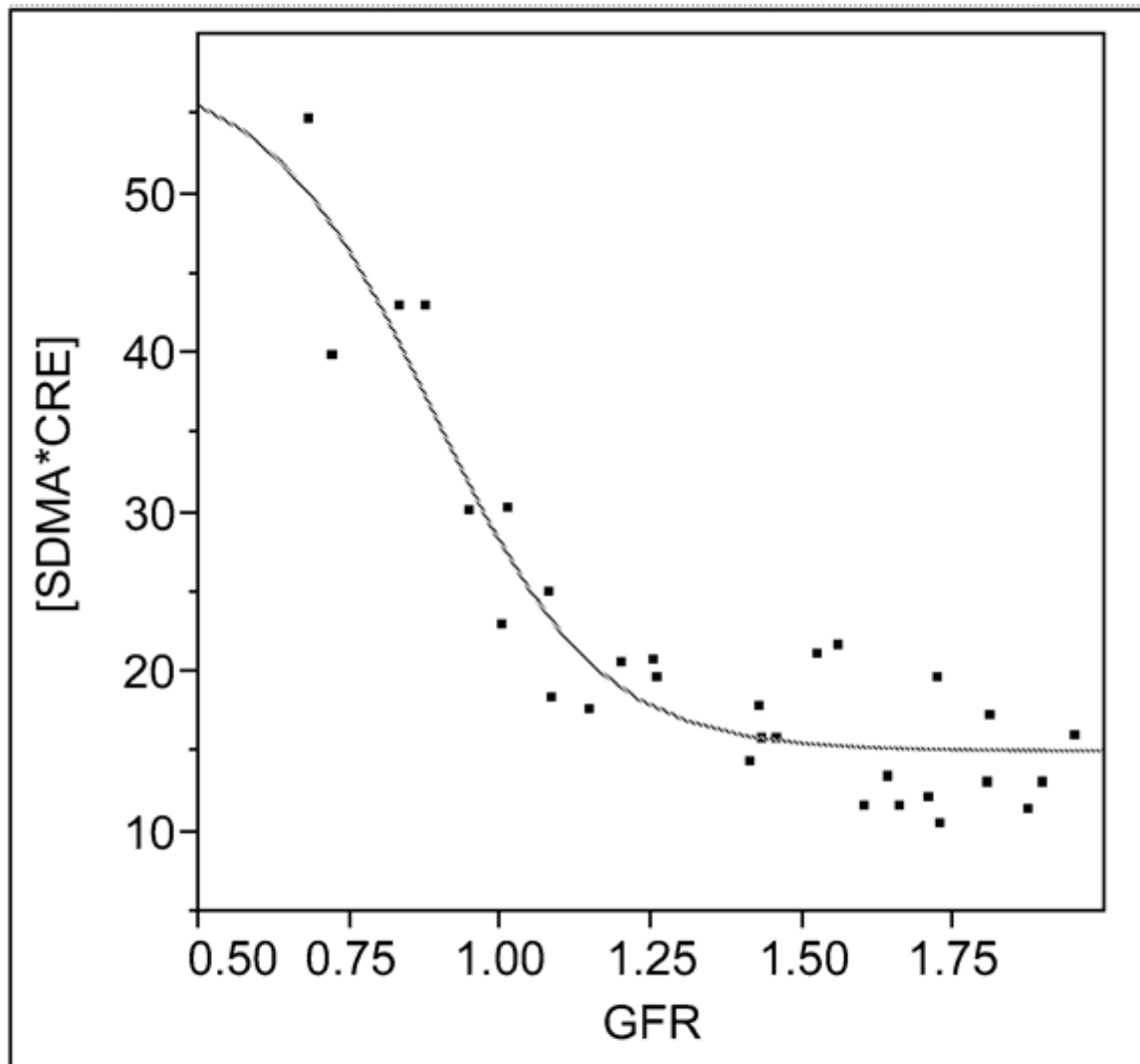
**4P logística****Resumen del ajuste**

AICc	143.44087
BIC	147.94685
SSE	138.10522
MSE	5.3117394
RMSE	2.3047211
R cuadrado	0.7265063

FIG. 10**4P logística****Resumen del ajuste**

AICc	-22.21468
BIC	-17.7087
SSE	0.5522051
MSE	0.0212387
RMSE	0.1457349
R cuadrado	0.8245038

FIG. 11

**4P logística****Resumen del ajuste**

AICc	174.99167
BIC	179.49766
SSE	395.32547
MSE	15.204826
RMSE	3.8993366
R cuadrado	0.885245

FIG. 12

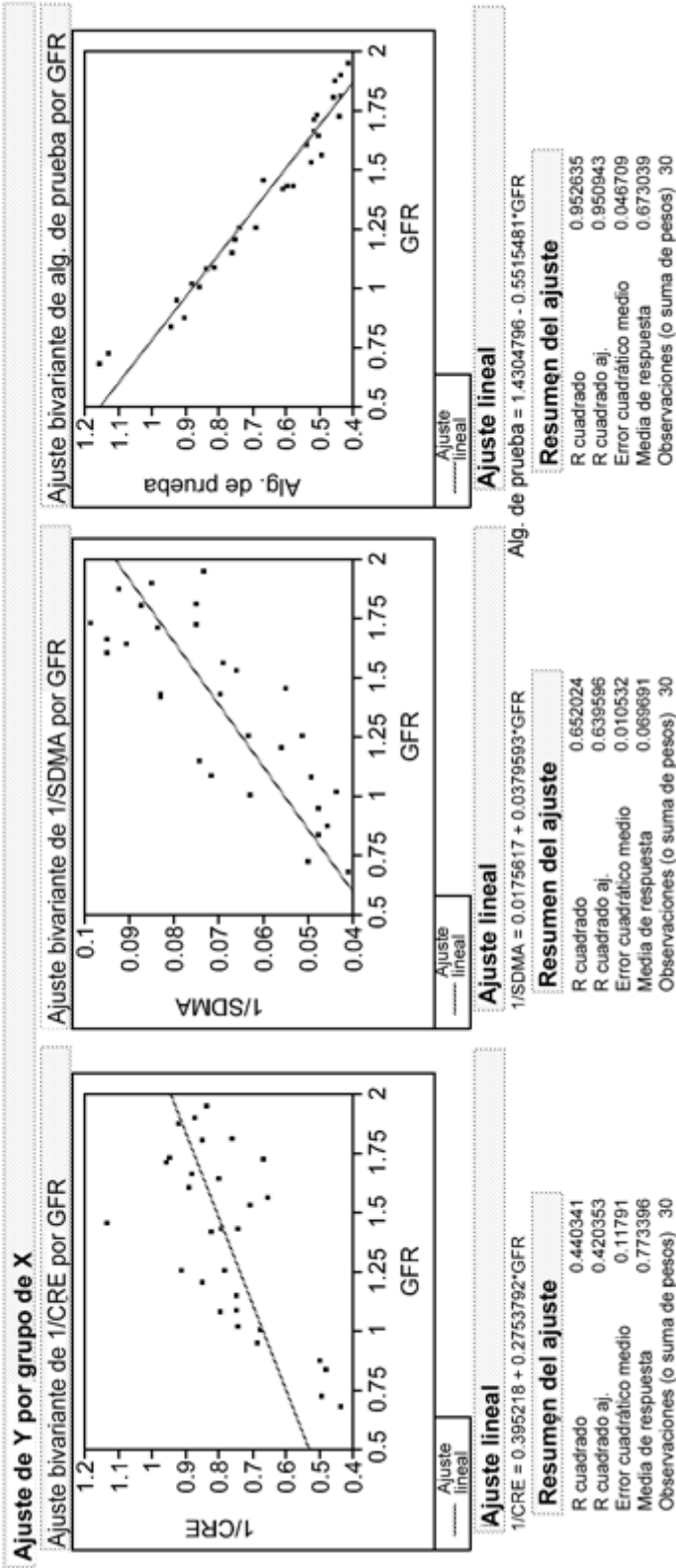


FIG. 13

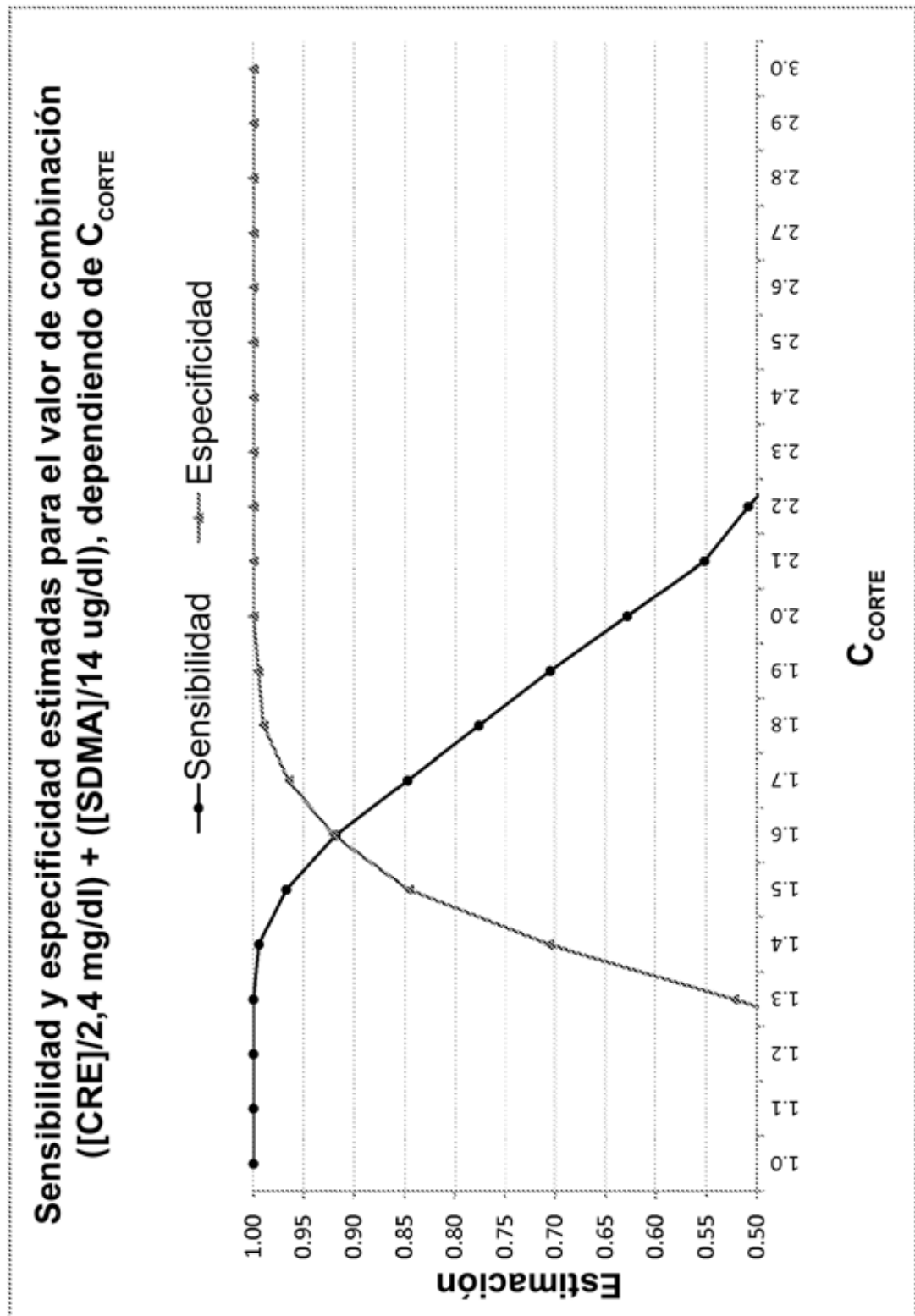


FIG. 14

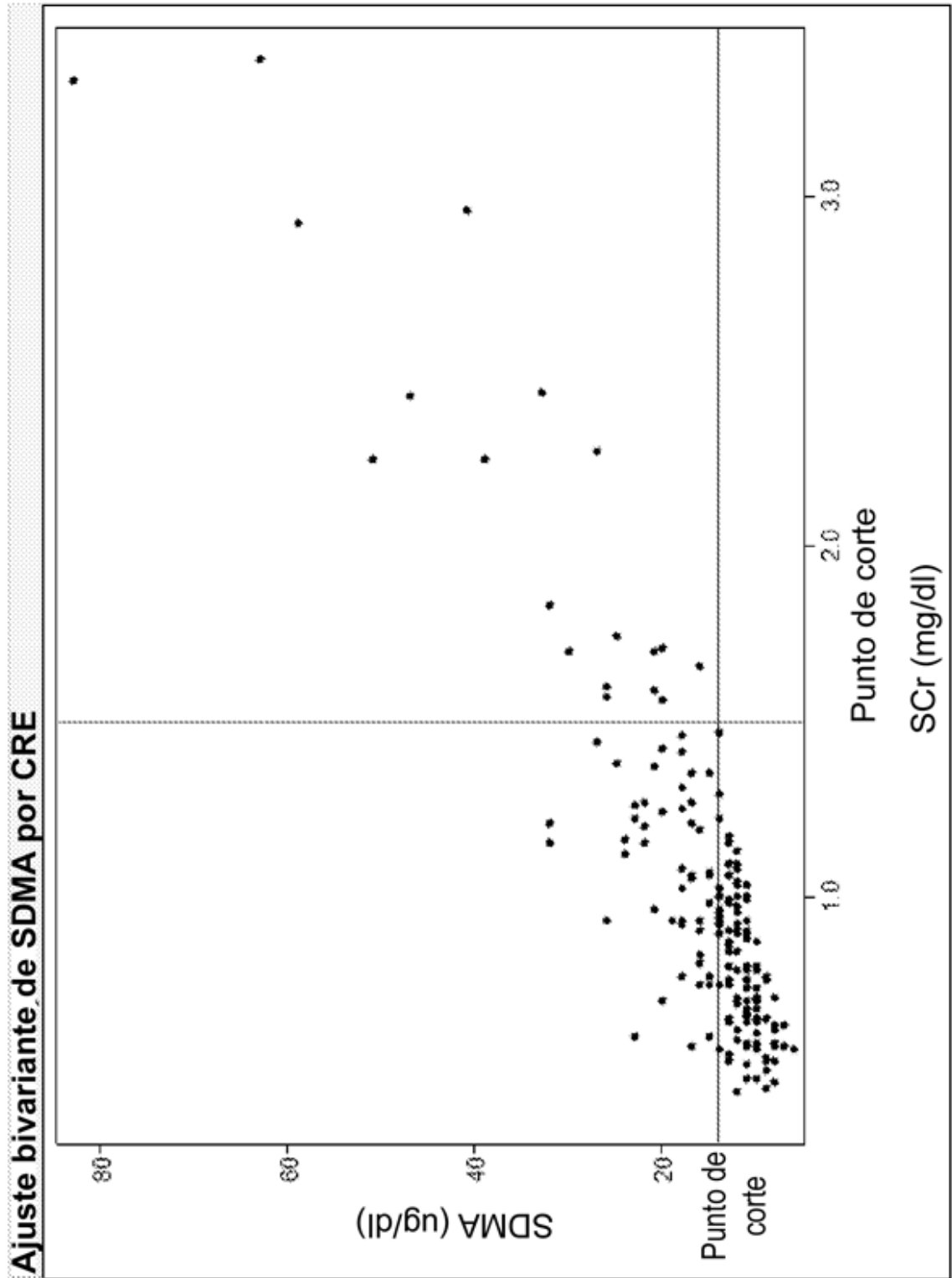


FIG. 15

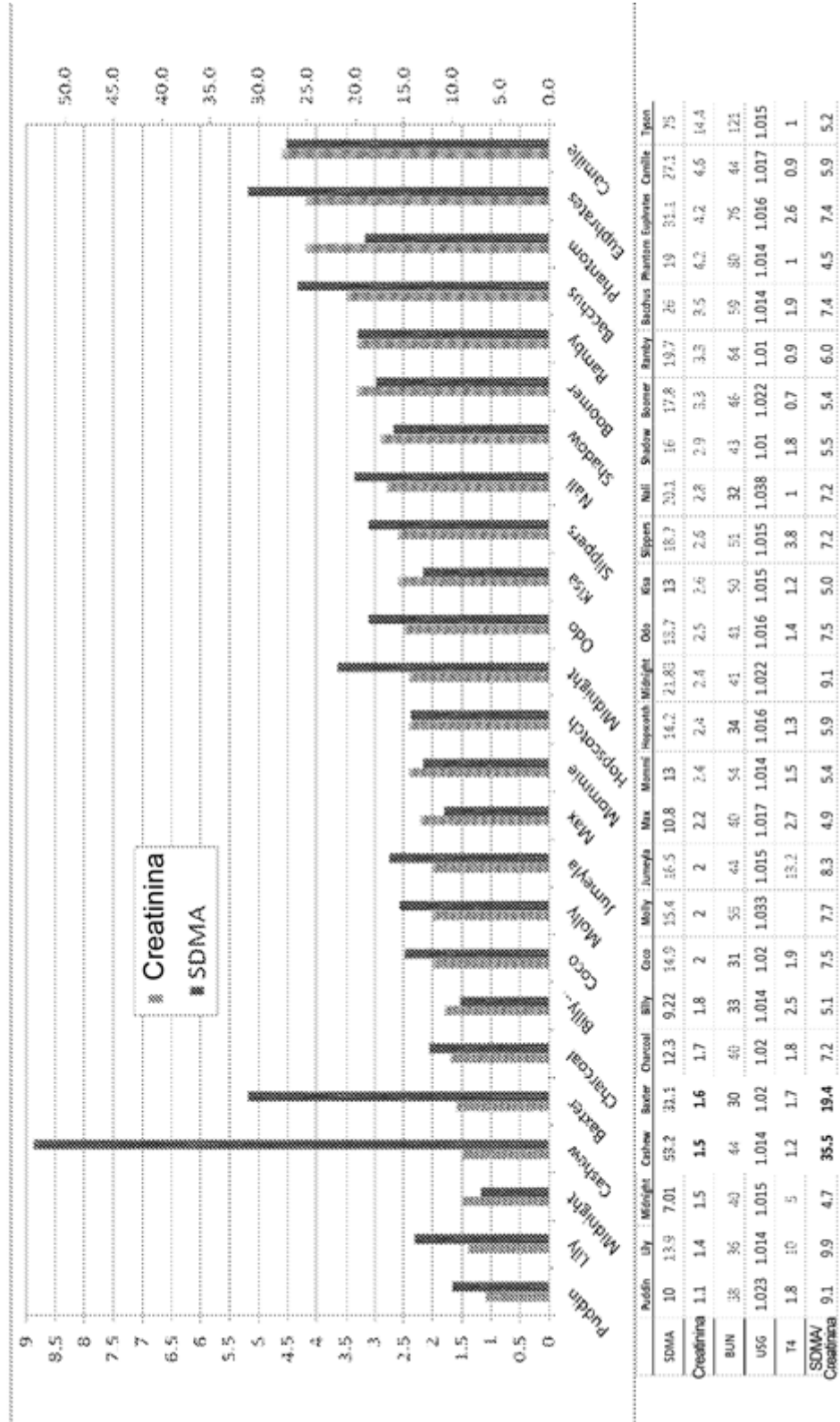


FIG. 16

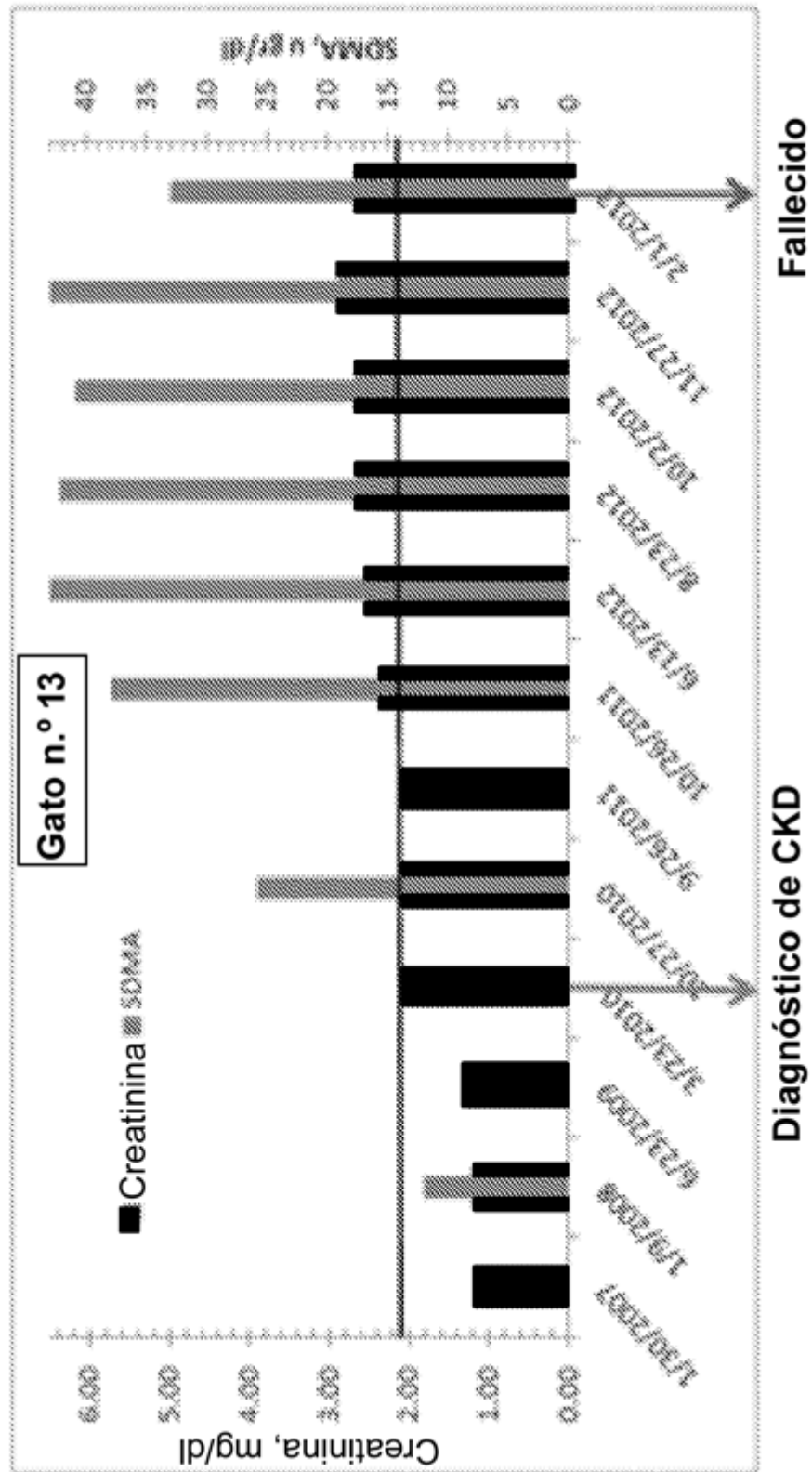


FIG. 17

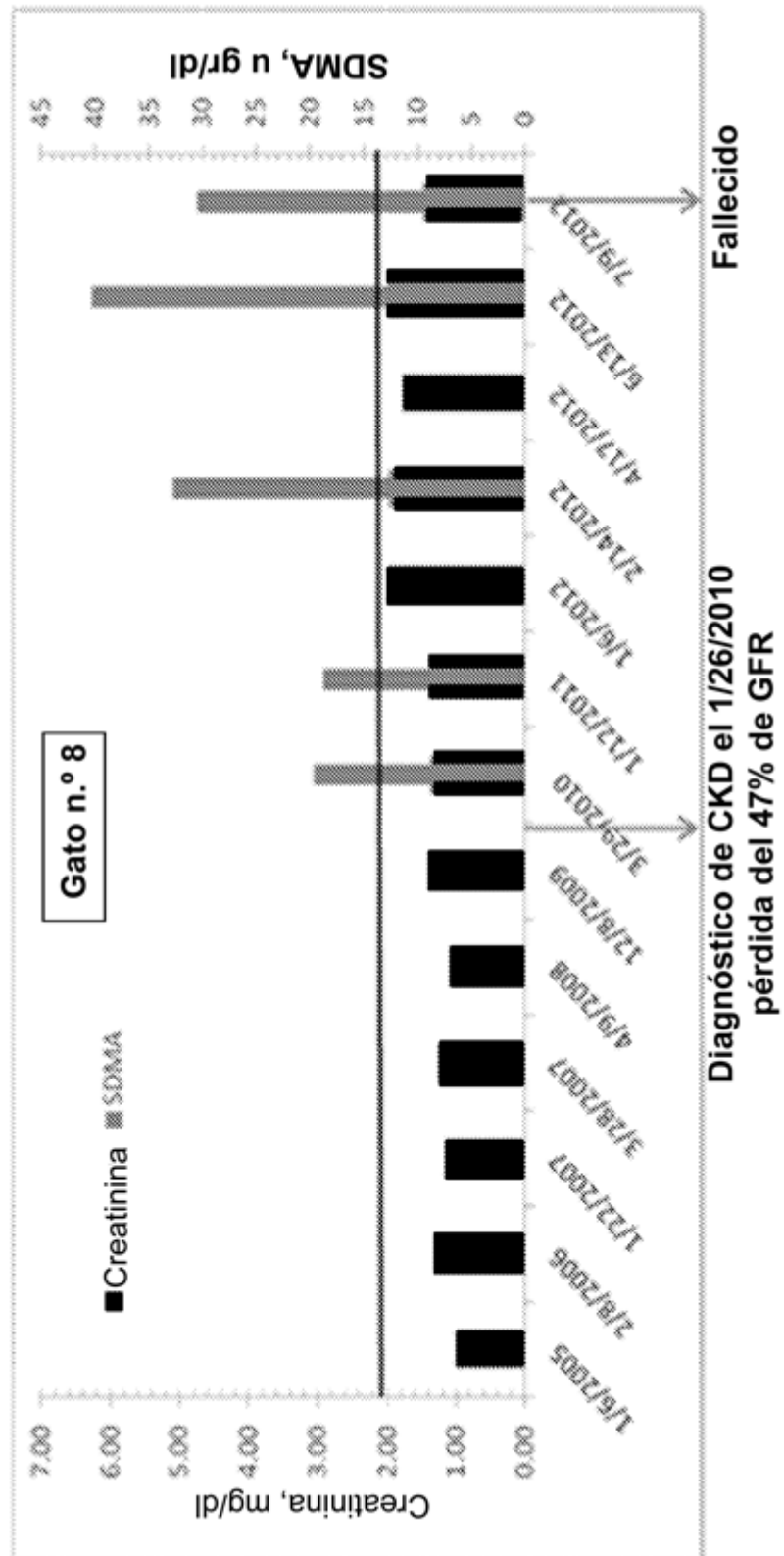


FIG. 18

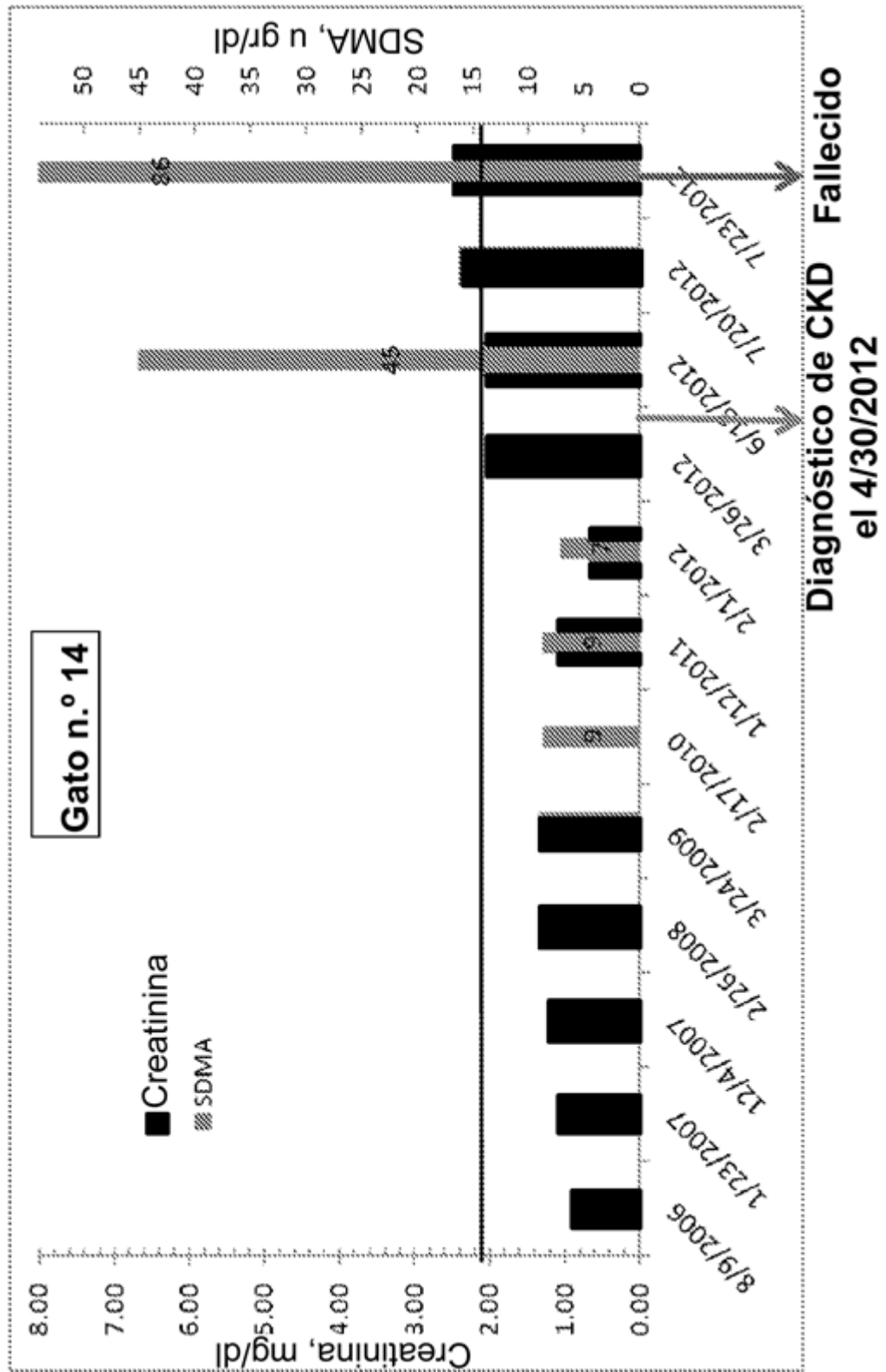
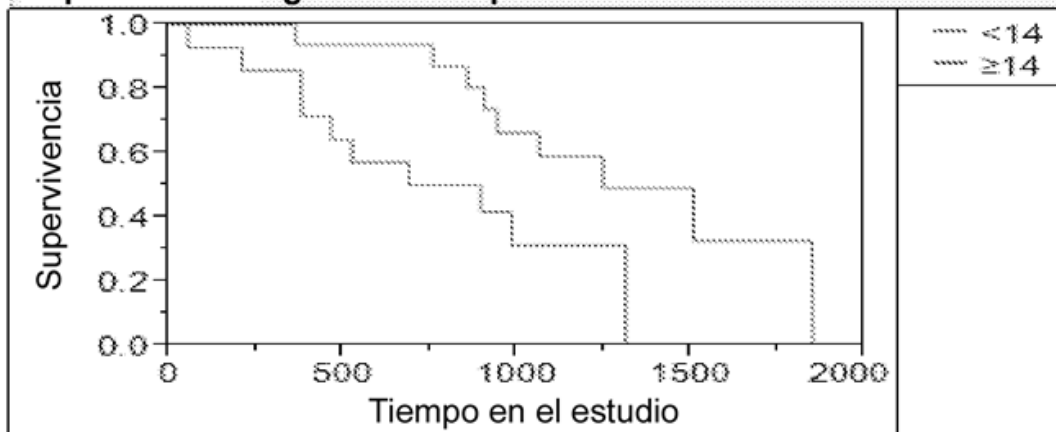


FIG. 19

Ajuste de supervivencia de límite de producto**Representación gráfica de supervivencia**

Tiempo hasta el acontecimiento: tiempo en el estudio

Censurado por censor

Código de censor 1

Agrupado por grupo

Resumen

Grupo	Número de fallos	Número de censurados	Media	Error estándar
<14	9	7	1314.61	136.122
≥14	10	4	780.5	124.584
	19	11	1088.34	111.479

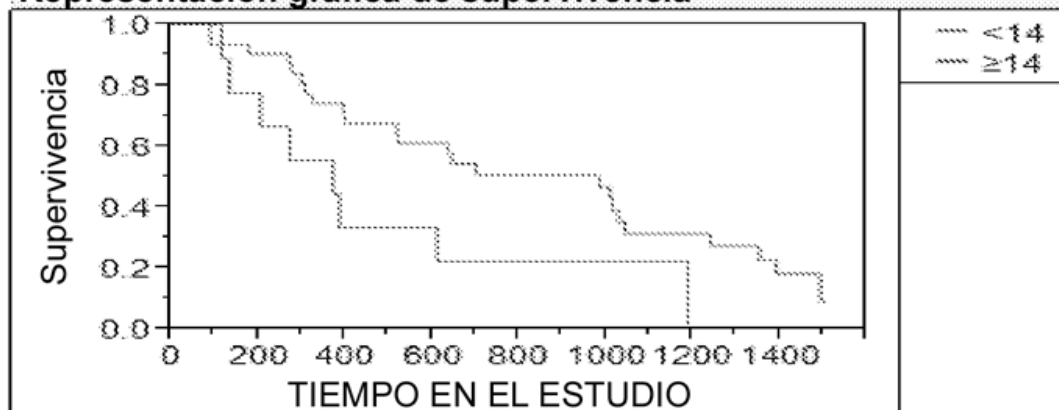
Cuantiles

Grupo	Mediana del tiempo	Inferior al 95%	Superior al 95%	Fallos al 25%	Fallos al 75%
<14	1249	906	1850	906	1850
≥14	792	378	1313	380	1313
Combinado	1063	859	1507	689	1507

Pruebas entre grupos

Prueba	Chi cuadrado	DF	Prob>Chi cuadrado
Rangos log.	4.8239	1	0.0281*
Wilcoxon	4.9198	1	0.0266*

FIG. 20

Ajuste de supervivencia de límite de producto**Representación gráfica de supervivencia**

Tiempo hasta el acontecimiento: TIEMPO EN EL ESTUDIO

Censurado por CENSOR

Código de censor 1

Agrupado por GRUPO

Resumen

Grupo	Número de fallos	Número de censurados	Media	Error estándar
<14	24	7	832.617 Sesgado	90.7257
≥14	8	1	497.111	141.171
Combinado	32	8	762.342 Sesgado	80.412

Cuantiles

Grupo	Mediana del tiempo	Inferior al 95%	Superior al 95%	Fallos al 25%	Fallos al 75%
<14	985	399	1043	324	1353
≥14	372	115	1189	205	612
Combinado	636	386	1029	303.5	1240

Pruebas entre grupos

Prueba	Chi cuadrado	DF	Prob>Chi cuadrado
Rangos log.	3.3010	1	0.0692
Wilcoxon	3.7230	1	0.0537