

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 086**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2017** **E 17153745 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019** **EP 3355058**

54 Título: **Nueva prueba para el monitoreo de la enfermedad renal**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.07.2020**

73 Titular/es:

**HELENA LABORATORIES (UK) LTD. (100.0%)  
Queensway South Team Valley Trading Estate  
Gateshead, Tyne and Wear NE11 0SD, GB**

72 Inventor/es:

**DELANGHE, SIGURD;  
MOERMAN, ALENA;  
SPEECKAERT, MARIJN y  
DELANGHE, JORIS**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 774 086 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**

Nueva prueba para el monitoreo de la enfermedad renal

5 La invención se refiere a un nuevo método para determinar la albúmina sérica carbamylada en una muestra de sangre o plasma y de esta manera un nuevo método para monitorear el desarrollo de la enfermedad que se caracteriza por un aumento de la urea, más particularmente enfermedades como la enfermedad renal crónica (CKD) y otras enfermedades renales, tales como la ESRD (enfermedad renal en estadio terminal).

10 Se estima que la enfermedad renal crónica (CKD) afecta al 5-10 % de los adultos en los países industrializados, tal como los Estados Unidos (Eknoyan y otros, *Kidney Int.* 66: 1310-4, 2004). Todos los pacientes con evidencia de daño renal persistente, es decir, por >90 días, se definen como que tienen CKD. El daño renal se refiere a cualquier patología renal que tenga el potencial de provocar una reducción en la capacidad funcional renal. Esto se asocia generalmente con una reducción en la tasa de filtración glomerular (GFR), pero pueden perderse otras funciones importantes sin que esto se produzca.

La CKD se clasifica normalmente en sub-estadios en función de la magnitud de la reducción de la GFR de acuerdo con la tabla siguiente:

Tabla 1. Estratificación de la enfermedad renal crónica

Estadio	Descripción	GFR (ml/min/1,73 m <sup>2</sup> )
1	Daño renal con la GFR normal o elevada	≥ 90
2	Daño renal con disminución leve de la GFR	60 - 89
3A	GFR disminuida moderadamente	45 - 50
3B		30 - 44
4	GFR disminuida severamente	15 - 29
5	Insuficiencia renal (enfermedad renal en estadio terminal)	< 15

35 El daño renal puede detectarse directa o indirectamente. Puede encontrarse evidencia directa mediante la obtención de imágenes o en el examen histopatológico de una biopsia renal. Una gama de modalidades de obtención de imágenes, lo que incluye ultrasonido, tomografía computarizada (CT), resonancia magnética (MRI) y barrido de isótopos, puede detectar una serie de anomalías estructurales, lo que incluye enfermedad del riñón poliquístico, nefropatía por reflujo, pielonefritis crónica y enfermedad renovascular.

40 La histopatología de la biopsia renal es más útil para definir la enfermedad glomerular subyacente, tal como la nefropatía por inmunoglobulina A (IgA) o la glomeruloesclerosis focal.

45 Puede inferirse evidencia indirecta de daño renal a partir del análisis de orina o sangre. La inflamación glomerular o el funcionamiento anormal pueden conducir a la fuga de glóbulos rojos o proteínas a la orina, lo que a su vez puede detectarse como proteinuria o hematuria. Las anomalías urinarias pueden tener causas alternativas no relacionadas con la disfunción renal y existen problemas metodológicos asociados con su medición.

50 La evidencia clínica en las pruebas de orina sugiere que las pruebas de tira reactiva de orina no pueden usarse de manera confiable para diagnosticar la presencia o ausencia de proteinuria, aunque existe evidencia de que la proteinuria por tira reactiva (≥1+) predice la ESRD y la enfermedad cardiovascular. No existe evidencia de que la UTI asintomática aislada provoque proteinuria/albuminuria. La relación proteína/creatinina (PCR) y la relación albúmina/creatinina (ACR) son pruebas de descarte más precisas en poblaciones con alta probabilidad de proteinuria. La PCR y la ACR predicen la progresión posterior de la enfermedad renal. Además, se ha demostrado que la ACR predice la enfermedad cardiovascular, aunque no se identificó evidencia similar para la PCR.

55 Históricamente, la medición de creatinina o urea en suero o plasma se ha usado para evaluar la función renal. Ambas son convenientes pero no sensitivas (la tasa de filtración glomerular debe reducirse a la mitad antes de que se evidencie un aumento significativo en la creatinina sérica). Además, las concentraciones séricas de creatinina se afectan por diversas interferencias analíticas y dependen críticamente de la masa muscular, por ejemplo, una concentración de creatinina sérica de 130 micromol/l podría ser normal en un individuo, pero requiere investigación adicional en otro.

60 Se han usado otros marcadores diversos para estimar el aclaramiento, lo que incluye inulina, iohexol y marcadores radioisotópicos tales como el ácido 51Cr-etilendiaminotetraacético (EDTA), el ácido 99mTc-dietilentriaminopentaacético (DTPA) y el 125I-iotalamato. La medición de cualquiera de estos marcadores es demasiado costosa y laboriosa para aplicarse ampliamente. Para el propósito de evaluar los métodos de evaluación de la GFR, el aclaramiento de inulina se

considera ampliamente como la estimación más precisa (estándar de oro) de la GFR, mientras que los métodos radioisotópicos mencionados anteriormente se aceptan como estándares de referencia validados

5 La carbamitación es la unión no enzimática del cianato derivado de la urea a los grupos amino libres en las proteínas, y se acumula a medida que disminuye la función del riñón (Kwan, J. y otros, 1992, Ann. Clin. Biochem. 29:206-209; Balion, C. y otros, 1998, Kidney Int. 53:488-495)). Las alteraciones post-traduccionales de las proteínas de la carbamitación se han implicado en la progresión de diversas enfermedades al cambiar la carga, la estructura y la función de enzimas, hormonas y receptores (por ejemplo Jaisson, S. y otros, 2011, Clin. Chem. 57:1499-1505). Por ejemplo, cuando se carbamitan, proteínas tan diversas como el colágeno y las LDL aceleran los eventos bioquímicos de la aterosclerosis. Las proteínas con vidas medias largas proporcionan una indicación promediada en el tiempo de la carga de carbamitación análoga a la relación entre la glucosa sérica y la hemoglobina glucosilada (Kwan, 1992).

15 La proporción de albúmina carbamitada se correlaciona fuertemente con las concentraciones de urea en sangre y se asocia fuertemente con la mortalidad por todas las causas en pacientes en hemodiálisis (Ber, A. y otros, 2013, Sci. Transl. Med. 5:175ra29). En este estudio se encontró que la proporción de albúmina humana carbamitada, que tiene un sitio de carbamitación predominante en Lys(549) (% C-Alb), se correlacionó con las concentraciones de urea en sangre promediadas en el tiempo y fue dos veces más alta en pacientes con ESRD que en sujetos no urémicos (0,90 % frente a 0,42 %). Se sugirió que la medición de la albúmina humana carbamitada sería un buen indicador del progreso de la CKD, especialmente de la ESRD (documento US20140228296).

20 Pueden usarse métodos estándar para medir los niveles de albúmina carbamitada en cualquier fluido corporal, lo que incluye, pero no se limita a, orina, suero, plasma, saliva, líquido amniótico o líquido cefalorraquídeo. Dichos métodos incluyen inmunoensayo, inmunoensayo enzimático, ELISA, "ensayos sandwich", inmunoturbidimetría, inmunonefelometría, transferencia Western mediante el uso de anticuerpos dirigidos específicamente a la albúmina carbamitada, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteínas A o G y ensayos de inmunolectroforesis y técnicas de inmunoensayo enzimático cuantitativo tales como las descritas en Ong y otros (Obstet. Gynecol. 98:608-11, 2001) y Su y otros (Obstet. Gynecol. 97:898-904, 2001). Sin embargo, la mayoría de estos métodos son bastante laboriosos y/o bastante costosos y se desea un método más simple y económico.

30 En la actualidad, la evaluación por cromatografía líquida de la carbamitación requiere el análisis de compuestos derivados de la carbamitación característicos tales como la e-carbamillisina (homocitrulina) (Jaisson S. y otros, Anal Bioanal Chem 2012;402:1635-41).

35 La electroforesis capilar está disponible en la mayoría de los laboratorios clínicos de rutina. La técnica se caracteriza por una alta resolución, lo que hace que sea muy adecuada para detectar cambios post-transcripcionales. La albúmina es la proteína plasmática más abundante y tiene una vida media in vivo de  $10,5 \pm 1,5$  días (Sterling, K., J Clin Invest. 1951;30(11):1228-1237), lo que la hace muy adecuada para estudiar la carbamitación.

40 Los presentes inventores encontraron ahora que la electroforesis capilar puede usarse muy bien para evaluar la cantidad de albúmina carbamitada y al hacer esto diagnosticar y seguir el desarrollo de la enfermedad renal crónica.

45 En consecuencia, la invención comprende un método para monitorear la enfermedad renal en un sujeto, que comprende someter una muestra de suero que comprende albúmina de ese sujeto a electroforesis, preferentemente, electroforesis capilar, con mayor preferencia, en donde el capilar es un capilar de sílice fundida, en donde la albúmina carbamitada se usa como un biomarcador para el monitoreo de la enfermedad renal. Preferentemente, en dicho método, la electroforesis se lleva a cabo en un líquido acuoso tamponado, que tiene un pH alcalino. Más detalles sobre los tampones preferidos pueden encontrarse más abajo. Además, se prefiere que la muestra sea suero sanguíneo.

50 La invención es ventajosa específicamente cuando la enfermedad renal es la ESRD.

En una modalidad preferida adicional, el monitoreo comprende determinar la relación de simetría del pico de la albúmina sérica determinada (la relación es una medida de la cantidad relativa de albúmina sérica carbamitada con respecto a la albúmina sérica nativa).

55 Una parte adicional de la invención es el uso de la electroforesis, preferentemente la electroforesis capilar, mediante el uso de un tampón de separación que tiene un pH en el intervalo de 9,3 a 10,7 o un tampón de separación, que comprende borato, que tiene un pH en el intervalo de 8 a 11 para determinar la cantidad absoluta o relativa de albúmina sérica carbamitada en un fluido biológico, basado en la relación de simetría del pico de albúmina sérica.

60 Además, parte de la presente invención es un método para determinar la cantidad relativa de albúmina sérica carbamitada con respecto a la albúmina sérica nativa mediante electroforesis capilar sobre la base de la relación de simetría del pico de albúmina sérica de la electroforesis.

En otra modalidad, la invención comprende un método para evaluar la gravedad de la enfermedad renal mediante la determinación de la relación de simetría del pico de albúmina sérica (que representa la albúmina carbamylada y no carbamylada) en un ensayo de electroforesis, preferentemente, un ensayo de electroforesis capilar.

5 La invención comprende, además, un sistema para la determinación de la albúmina sérica carbamylada, dicho sistema comprende:

– un sistema de electroforesis, preferentemente, un sistema de electroforesis capilar;

10 – medios de computación adaptados para calcular la simetría del pico de albúmina sérica de electroforesis;

– medios de salida para suministrar el resultado del cálculo y/o la determinación.

15 Preferentemente, dicho sistema es un sistema en donde los medios de computación comprenden una computadora provista con algoritmos de programas informáticos apropiados. Se prefiere adicionalmente un sistema, en donde los medios de salida comprenden una pantalla de resultados, una impresora o cualquier otro dispositivo para la comunicación con el usuario del sistema. En otra modalidad preferida, el sistema es un sistema portátil. En una modalidad adicional, el sistema comprende, además, un generador de una señal de alarma que se activa si la relación de simetría alcanza un valor umbral predeterminado

20

Leyendas de las figuras

25 La Figura 1 muestra la carbamylación *in vitro* de la albúmina sérica, en la esquina superior izquierda un espécimen control, en la esquina superior derecha después de la incubación con 1 mmol/l de KCNO (factor de simetría: 0,648), en la izquierda inferior con 10 mmol/l de KCNO (factor de simetría: 0,576) y en la derecha inferior después de una incubación con 150 mmol/l de KCNO.

30 Figura 2: Espectro después de la electroforesis capilar del suero que muestra el cálculo del factor de simetría. El eje x representa el tiempo de migración (s), el eje y se normalizó en el pico de albúmina.

Figura 3. Factor de simetría de la albúmina sérica en controles y estadios de CKD (1-5) (n = 240).

35 Figura 4: Curva ROC del factor de simetría de la albúmina para la CKD del estadio 2 hasta el 5. El eje y representa la sensibilidad, el eje x la especificidad.

40

Descripción detallada

Definiciones

40 Todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención, a menos que el término técnico o científico se defina de manera diferente en la presente descripción.

45 El término "o", como se usa en la presente descripción significa "y/o" a menos que se especifique de cualquier otra manera. El término "un" o "una" como se usa en la presente descripción significa "al menos uno" a menos que se especifique de cualquier otra manera.

Al referirse a un sujeto (por ejemplo, un compuesto, un aditivo, etc.), en singular, se pretende que sea incluido el plural.

50 Al referirse en la presente descripción a un pH, se pretende el pH según se mide por un medidor Mettler-Toledo SevenEasy con un electrodo de unión abierta InLab Expert Pro con electrodo de referencia integral Argenthal y sensor de temperatura, calibrado mediante una curva de calibración de tres puntos con pH de referencia de 4,00, 7,00 y 10,00 a 20 °C, a menos que se especifique de cualquier otra manera.

55 La "relación de simetría" de un pico es una medida de la asimetría de un pico obtenido en la electroforesis, preferentemente, electroforesis capilar. Un pico que tiene una relación de simetría de 1 es un pico del cual las dos mitades, cuando se separan por una línea vertical en la parte superior del pico, son completamente simétricas, es decir, cuando esas dos mitades son imágenes especulares exactas. La relación de simetría es menor que uno si una pendiente del pico es más asimétrica que la otra pendiente. Más precisamente (ver, además, la Figura 2), en el valor Y del pico de albúmina, que corresponde al 10 % de la altura máxima del pico de albúmina, la distancia horizontal desde el punto izquierdo de la curva hasta la línea perpendicular a la parte superior del pico se designa como "a", la distancia desde el punto correspondiente en la parte derecha de la curva a esa línea perpendicular se designa como "b". El factor de simetría se forma por la relación a/b.

60

La electroforesis ha sido un método bien establecido para el análisis de varias muestras, que incluyen muestras que comprenden compuestos biológicos tal como proteínas, durante muchas décadas.

A través de los años se han desarrollado métodos bien establecidos. Por ejemplo, la separación de proteínas séricas mediante electroforesis en una serie de bandas características, denominadas comúnmente como gamma, beta, alfa-1 y 2 y albúmina se conoce bien por los expertos en la técnica y se describe bien en una amplia variedad de materiales de referencia, tales como el manual 'Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis' por David F. Keren, 2003, Arnold Publications.

La electroforesis capilar es una forma específica de electroforesis, en donde se usa un capilar para realizar la electroforesis. La electroforesis capilar ofrece ventajas tales como tiempos de análisis cortos y una alta resolución.

En principio, puede usarse cualquier forma de electroforesis. Particularmente, los buenos resultados se obtuvieron con la electroforesis zonal.

Preferentemente, la electroforesis se lleva a cabo en un canal, aunque en principio un método de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo en una placa o similar (como en la electroforesis horizontal en gel convencional). En una modalidad preferida particularmente, el canal es un capilar, en cuyo caso la técnica de electroforesis se denomina generalmente como electroforesis capilar (CE). En una modalidad específica, la electroforesis puede llevarse a cabo en un canal de un dispositivo de microfluído o similar, cuya técnica se denomina frecuentemente en la técnica como 'CE en un chip'. Más información sobre la CE puede encontrarse en el manuscrito de revisión 'Clinical Analysis by Microchip Capillary Electrophoresis' por Sam Li y Larry Kricka, Clinical Chemistry 52, p37-45, 2006, y las referencias citadas en este.

La pared interior del canal (capilar), puede comprender particularmente grupos ácidos de los cuales al menos una porción se disocia cuando está en contacto con el tampón alcalino, de manera que puede hacerse uso de un flujo electro-osmótico durante la separación. En un método preferido particularmente de la invención que usa la electroforesis capilar, el flujo electro-osmótico se dirige desde el lado de entrada del capilar hacia el lado de salida del capilar, de manera que los constituyentes de la muestra (tales como las proteínas) que tienen el mismo signo de carga que el electrodo de salida (carga negativa) también se arrastran hacia el detector, y por lo tanto, se detectan materiales adecuados que se conocen generalmente en la técnica. Un material muy preferido que comprende tales grupos ácidos es sílice, particularmente, sílice fundida.

- El uso de plasma sanguíneo o suero sanguíneo como una muestra es particularmente ventajoso porque la variación de pH en dichas muestras es relativamente pequeña, por ejemplo, en comparación con la orina. Además, la variación de muestra a muestra en las concentraciones de los electrolitos principales es relativamente pequeña entre diversas muestras de plasma/suero sanguíneo. Esto es ventajoso en particular, porque los cambios en el pH o la concentración de electrolitos en una muestra pueden afectar la forma de los picos de proteínas, tal como el pico de albúmina. De esta manera, la determinación precisa de una desviación de una forma de pico normal, y por lo tanto, de una desviación en la relación de simetría.

Las condiciones de separación pueden basarse en un método conocido *per se*, *por ejemplo*, en la técnica anterior descrita anteriormente para el análisis de un analito específico, en este caso albúmina sérica y/o albúmina sérica carbamílada. Además, las soluciones tampón para electroforesis están disponibles comercialmente para diversos analitos, especialmente para proteínas séricas, tales como la albúmina sérica.

Generalmente, es ventajoso usar una solución tampón que tiene un pH que es aproximadamente el mismo o superior que el pKa (promedio) del analito, de manera que al menos la mayoría de las funciones de ácido en esta molécula se ionizan para formar grupos aniónicos. Particularmente, la separación de la muestra puede llevarse a cabo mediante el uso de una solución que tiene un pH alcalino, particularmente un pH en el intervalo de pH 8,0 a 11,0, preferentemente, un pH en el intervalo de pH 9,0 a 10,7, con mayor preferencia, en el intervalo de 9,3-10,7, por ejemplo, aproximadamente 10,0. Preferentemente, la solución comprende un tampón de pH. Dicho tampón es generalmente una combinación de al menos un ácido y al menos una base (que puede ser la base conjugada del ácido), con un pKa de aproximadamente el pH de la solución (generalmente el pKa se encuentra en el intervalo de pH +/- 1 unidad de pH, preferentemente en el intervalo de +/- 0,5 unidades de pH).

Los ejemplos de ácidos/bases que pueden usarse para proporcionar soluciones tamponadas son tampones borato, fosfato y carbonato, tampones basados en aminoácidos y compuestos zwitteriónicos para proporcionar tampones, conocidos como tampones biológicos. Los ejemplos de ácidos/bases para tampones biológicos incluyen bis-TRIS (2-bis[2-hidroxietyl]amino-2-hidroxietyl-1,3-propanediol), ADA (ácido N-[2-acetamido]-2-iminodiacético), ACES (ácido 2-[2-acetamino]-2-aminoetanosulfónico), PIPES (ácido 1,4-piperazinedietanosulfónico), MOPSO (ácido 3-[N-morfolino]-2-hidroxiopropanosulfónico), bis-tris propano (1,3-bis[tris(hidroxietyl)metilaminopropano]), BES (ácido N,N-bis[2-hidroxietyl]-2-aminoetanosulfónico), MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico), TES (ácido 2-[2-hidroxi-1,1-bis(hidroxietyl)etilamino]etanosulfónico), HEPES (ácido N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-(2-etanosulfónico)), DIPSO (ácido 3-N,N-bis[2-hidroxietyl]amino-2-hidroxiopropanosulfónico), MOBS (ácido 4-N-morfolinobutanosulfónico), TAPSO (ácido 3[N-tris(hidroxietyl)metilamino]-2-hidroxiopropanosulfónico), TRIS (2-amino-2-[hidroxietyl]-1,3-propanediol), HEPPSO (ácido N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-(2-hidroxiopropanosulfónico)), POPSO (ácido piperazina-N,N'-bis[2-hidroxiopropanosulfónico]), TEA (trietanolamina), EPPS (ácido N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-(3-propanosulfónico)), TRICINA (N-tris[hidroxietyl]metilglicina), GLY-GLY (diglicina), BICINA (N,N-bis[2-hidroxietyl]glicina), HEPBS (ácido N-[2-

5 hidroxietil]-piperazina-N'-[4-butanosulfónico]), TAPS (ácido N-tris[hidroximetil]metil 3-aminopropanosulfónico), AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol), TABS (ácido N-tris[hidroximetil]metil-4-aminobutanosulfónico), AMPSO (ácido 3-[(1,1-dimetil-2-hidroxietil)amino]-2-hidroxiopropanosulfónico), CHES (ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico), CAPSO (ácido 3-[ciclohexilamino]-2-hidroxi-1-propanosulfónico), AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), CAPS (ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico) y CABS (ácido 4-[ciclohexilamino]-1-butanosulfónico).

10 Los kits adecuados que comprenden un tampón e instrucciones están disponibles comercialmente, por ejemplo, el kit CE-Sure SPE, disponible desde mediados de la década de 1990, de Helena Biosciences (Gateshead, Reino Unido). Además, en el documento US 2002/0162744, que describe un aditivo que interactúa con al menos una proteína sérica, en particular la albúmina, y modifica su movilidad electroforética, se describe una solución tampón alcalina de pH 10.

15 Cuando una muestra de suero o sangre se somete a electroforesis, aparecerán picos en la salida en los casos donde se presenten (altas) concentraciones de proteínas en la muestra. El pico más grande, con diferencia, en la salida de electroforesis de una muestra de sangre o suero es el pico que pertenece a la albúmina, y este pico siempre es reconocible. Ahora ha aparecido que la forma del pico de albúmina cambia como resultado de la carbamilación. En particular, una pendiente de este pico se vuelve más asimétrica a medida que aumenta la fracción de albúmina carbamilada. Ahora ha aparecido que existe una relación más o menos dependiente de la dosis con la magnitud de la carbamilación de las proteínas de albúmina (que en sí misma se relaciona con la gravedad de la enfermedad renal) y la asimetría del pico de albúmina. La asimetría del pico de albúmina puede calcularse fácilmente como la relación de simetría del pico. Ha aparecido que la relación de simetría del pico de albúmina en una muestra de una persona sana fue de aproximadamente 0,75 a 0,95, mientras que la relación de simetría de una muestra de una persona con ESDR fue de aproximadamente 0,4 a 0,6. Más particularmente, cuando se añadió KCNO a una muestra que contiene albúmina en una cantidad de 10 mM, ya pudo establecerse una clara distinción con la muestra no tratada. Se descubrió adicionalmente que incluso fue posible usar el parámetro de relación de simetría para distinguir entre los diferentes estadios de la enfermedad renal como se definió anteriormente. Estos valores se basan en análisis con el tampón de CE para el análisis de proteínas séricas, como puede obtenerse comercialmente de Helena Biosciences, Tyne y Wear, Reino Unido. En consecuencia, la presente invención puede usarse para monitorear el desarrollo de la enfermedad renal en un sujeto. Dicho monitoreo comprende una medición repetitiva que indicará si la magnitud de la carbamilación y con eso la gravedad de la enfermedad ha aumentado o disminuido. Dicho monitoreo puede usarse ventajosamente para investigar si un tratamiento de la enfermedad habría tenido éxito y/o si la condición del paciente mejora.

30 Al comparar la electroforesis capilar con la HPLC, parece que la CE tiene una mejor resolución, preparación de la muestra reducida, análisis más rápido, consumo de reactivo reducido y costo reducido. Además, solo se necesitan volúmenes de muestra en el intervalo de picolitros y nanolitros. En comparación con la espectroscopía de masas, la CE es un método muy simple, rápido y económico.

35 Otra ventaja de la CE es la ausencia de asimetría en el inicio de los picos: en la HPLC esta asimetría en el inicio de los picos puede producirse cuando se excede la capacidad de la columna. La electroforesis capilar combina alto rendimiento y análisis sensible. Además, la técnica puede automatizarse. Además, la separación es extremadamente eficiente, como lo evidencian los números de platos teóricos que exceden los 10 000 (Bortolotti F. y otros, Clin Chim Acta. 2007;380:4-7).

40 En la albúmina, la reacción de carbamilación tiene lugar preferentemente en el residuo de lisina 549. Los residuos de lisina portan una carga positiva a pH fisiológico. La unión de un grupo -CONH<sub>2</sub> induce una pérdida de esta carga positiva. La albúmina, que se carga negativamente a pH fisiológico, migra durante la electroforesis hacia el electrodo positivo debido a que el flujo electro-osmótico supera la movilidad electroforética. La eliminación de una carga positiva asociada con la formación de ε-carbamil-lisina de la homocitrulina aumenta la movilidad electroforética, lo que resulta en una migración más lenta. La asimetría en el inicio de los picos se debe en parte a la migración más lenta de la albúmina (Petersen, C.E., J Biol Chem 2000, 275(28): 20985-95).

45 Además, es posible usar el análisis electroforético como instrumento de diagnóstico para indicar el estadio de gravedad de la enfermedad renal (ver también la Figura 3 y la Tabla 2 en la parte experimental).

50 Además, la detección de la relación de simetría del pico de albúmina también permite una detección cuantitativa de la cantidad de albúmina carbamilada en la muestra. En primer lugar, una cuantificación del porcentaje de carbamilación puede obtenerse directamente a partir de la relación de simetría. Y, por supuesto, si se conoce la cantidad exacta de albúmina no carbamilada o de albúmina total en la muestra, puede entonces calcularse la cantidad exacta de albúmina carbamilada

55 El análisis de electroforesis se realiza, preferentemente, en un sistema en el que el analizador de electroforesis se acopla a medios de computación para calcular la simetría del pico de albúmina sérica de la electroforesis y medios de salida para suministrar el resultado del cálculo y/o la determinación.

60 Dichos medios de computación pueden ser cualquier computadora o dispositivo que comprenda un algoritmo de programa informático al que la computadora o dispositivo es capaz de conectarse y recibir la salida del analizador de electroforesis, es capaz de detectar el pico que pertenece a la albúmina y es capaz de medir la asimetría de dicho pico y a partir de ahí la relación de simetría como se definió anteriormente. En este sistema, la salida del analizador de electroforesis puede

5 ser analógica o digital. Si la salida es analógica, los medios de computación generalmente comprenderán un convertidor de analógico a digital para digitalizar la entrada y hacerla adecuada para su posterior análisis y detección por el algoritmo de programa informático. Este algoritmo de programa informático (también denominado en la presente descripción como "programa") es capaz de detectar el pico que pertenece a la albúmina. Esto puede hacerse ventajosamente para detectar el pico con el valor más alto en la señal de electroforesis completa. Después, el programa debe calcular los valores bajo la curva para el pico (AUC) y a partir de ahí la asimetría de las pendientes del pico. Esto derivará entonces en una cifra que indique la relación de simetría. Esta cifra puede mostrarse en los medios de salida, pero los medios de computación también pueden 'traducir' el resultado obtenido a un estadio de la enfermedad renal (de acuerdo con la tabla que se muestra arriba) al comparar el resultado obtenido con mediciones anteriores del mismo sujeto. Para hacer comparaciones, los medios de computación deben tener acceso a un almacenamiento de memoria donde los resultados de mediciones anteriores del mismo sujeto deben poder obtenerse y para que el sistema sepa qué muestra se mide, debe haber medios de entrada en los que pueda indicarse la naturaleza (e identificación) del sujeto y cualesquiera detalles adicionales que necesiten almacenarse con los resultados de la muestra. Por supuesto, si es necesario almacenar los resultados, los medios de computación deben tener una conexión a un medio de almacenamiento adecuado, tal como un disco duro o cualquier otro dispositivo de almacenamiento de datos informáticos. También sería posible que los datos se almacenen en una ubicación remota del sistema. Para que esto se logre, el sistema debe ser capaz de conectarse a este medio de almacenamiento remoto mediante un acoplamiento directo intermitente ("engancharse" regularmente al dispositivo de almacenamiento) o mediante una conexión inalámbrica, tal como infrarrojo, WiFi (3G, 4G, 5G) o BlueTooth.

20 Los medios de salida pueden ser cualquier medio en el que pueda visualizarse una salida, tal como mediante impresión, sonido o por pantalla. En consecuencia, los medios de salida pueden ser una impresora o un monitor, tal como una pantalla LED o cualquier otro tipo de monitor.

25 En una modalidad, el dispositivo es un dispositivo que es portátil. Esto puede lograrse ventajosamente si el analizador de electroforesis en sí mismo es pequeño, tal como un dispositivo microfluido o chip. Un dispositivo microfluido tiene la ventaja adicional de que el volumen de la muestra que necesita proporcionarse puede ser muy pequeño. Por lo tanto, también se ha vuelto práctico que la muestra pueda tomarse sin la intervención de un médico u otro personal con educación médica. Por ejemplo, si la muestra puede ser pequeña, sería muy práctico y ventajoso obtener una muestra a través de un pinchazo en el dedo. Entonces, el propio sujeto sería capaz de obtener una muestra y realizar la prueba.

30 En tal caso, una modalidad preferida de la presente invención es un sistema que es capaz de proporcionar una señal de alarma si el valor medido excede un valor umbral preestablecido. La alarma puede tomar cualquier forma, tal como una señal de sonido o luz y/o un mensaje de texto en el dispositivo de salida del sistema. Si el sistema puede conectarse a sistemas remotos (tal como se discutió anteriormente para el almacenamiento de datos), también puede ser ventajoso si la señal de alarma se envía a dicha ubicación remota. De esta manera, puede ser posible que los datos medidos y el mensaje de alarma se transmitan a y/o se almacenen en el sistema del médico o especialista médico donde el sujeto está bajo tratamiento.

40 La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos.

## EJEMPLO

### Materiales y métodos

#### 45 Estudio de población

50 Treinta y nueve voluntarios sanos (20 hombres, 19 mujeres, edad:  $39 \pm 12$  años) participaron en el estudio. El intervalo de referencia se definió por el intervalo entre los percentiles 2,5 y 97,5 del grupo control. Además, se investigó el suero de 20 pacientes con enfermedad renal crónica que presentaban CKD 2 (12 hombres, 8 mujeres), 21 pacientes que mostraban estadios 3A (16 hombres, 5 mujeres) y 3B de CKD (15 hombres, 6 mujeres), 21 pacientes que presentaban CKD en estadio 4 (15 hombres, 6 mujeres). Además, se inscribieron en el estudio 73 pacientes con enfermedad renal en estadio terminal (CKD 5) (47 hombres, 26 mujeres), tratados con hemodiálisis crónica.

55 El estudio se aprobó por el comité de ética local (2015/0932, número de registro belga B670201525559)

60 Se extrajo la sangre, los tubos se centrifugaron (10 min, 3000 rpm, temperatura ambiente) y se obtuvo el suero. En pacientes con ESRD, se tomó la muestra de sangre antes del inicio de una sesión de hemodiálisis. Se determinaron en suero los parámetros de rutina urea, creatinina, ácido úrico y albúmina. La albúmina se analizó mediante el uso de inmunonefelometría en un nefelómetro BN II (Siemens). La creatinina se analizó mediante el uso de un ensayo de picrato por el método cinético compensado (Wuyts, B. y otros, Clin Chem. 2003;49: 1011-4). La urea se analizó en un analizador Modular (Roche).

65 El eGFr se estimó mediante el uso de la fórmula CKD-EPI 2009 (colaboración en epidemiología de la enfermedad renal crónica) (Levey, A.S. y otros, Ann Intern Med. 2009; 150(9):604-612).

La carbamilación *in vitro* del suero se logró mediante la adición de 50 µl de cianato de potasio (Sigma, St Louis) en solución salina tamponada con fosfato (0,1 mol/l, pH 7,4) a 500 µl de suero. Se usaron soluciones con concentraciones finales de 10 a 100 mmol/l.

El Kt/V estandarizado (stdKT/V) se calculó de acuerdo con la fórmula (Gotch, F.A. y otros, *Kidney Int* 2000, 58(76): 3-18):

$$std \frac{Kt}{V} = 7.24.60.60. \frac{m}{C_0.V}$$

en el que K representa el aclaramiento de urea (m<sup>3</sup>/s), t el tiempo de diálisis (s), V el volumen de distribución (m<sup>3</sup>), m la tasa de generación de masa de urea (mol/s) y Co la concentración de urea al comienzo de la diálisis (mol/m<sup>3</sup>).

La electroforesis capilar del suero se llevó a cabo mediante el uso de un sistema de electroforesis capilar Helena V8 (Helena, Newcastle, Reino Unido). Dos µl de cada muestra de suero se diluyeron 50 veces (solución salina al 0,9 %) y se inyectaron automáticamente. La separación de proteínas se obtuvo mediante la aplicación de un voltaje de 9 kV en ocho capilares de sílice fundida controlados por el efecto Peltier. Se usó un noveno capilar como referencia (solo tampón). En el modo operativo estándar, la detección directa de proteínas se realizó mediante la medición de la absorbancia UV de las fracciones separadas a 210 nm. El rendimiento fue de 90 muestras/h. La CE Helena V8 se usó en una configuración estándar para la electroforesis en suero (Poisson, J. y otros, *Clin Biochem* 2012;45:697-9, 12).

Después de la electroforesis, se analizó la morfología de los picos de albúmina mediante el cálculo del factor de asimetría, con el uso del programa informático Platinum 4.1®. El factor de asimetría es una medida de la aparición de cola en el pico. Se define como la distancia desde la línea central del pico hasta la pendiente posterior dividida por la distancia desde la línea central del pico hasta la pendiente frontal, con todas las mediciones realizadas al 10 % de la altura máxima del pico.

La reproducibilidad del ensayo se evaluó mediante la repetición de una serie (n = 10) de tres agrupamientos de suero diferentes que mostraban una asimetría al inicio de los picos pronunciada, promedio y pequeña, respectivamente.

#### Estadística

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso del programa MedCalc. La normalidad de las distribuciones se probó mediante el uso de la prueba de D'Agostino-Pearson. Las diferencias entre los grupos de pacientes se evaluaron mediante el uso de la prueba de Kruskal-Wallis. Para investigar la correlación entre 2 variables continuas no normales, se realizó una prueba de correlación de rango por lo cual se calculó la rho de Spearman.

Para estudiar el efecto de diversos parámetros sobre el factor de simetría de la albúmina como variable dependiente, se usó un modelo de regresión múltiple. Se usó un método de eliminación hacia atrás. Las variables se incluyeron en el modelo si los valores de p eran inferiores a 0,05. Basado en el conjunto de datos agrupados, se construyó una curva ROC (característica de funcionamiento del receptor).

#### Resultados

La carbamilación *in vitro* (concentración final de isocianato: 10 -100 mmol/l) resultó en una alteración dependiente de la dosis de la simetría del pico de albúmina. La Figura 1 representa los ferogramas del suero no carbamilado y carbamilado y muestra el cambio gradual en la morfología del pico de albúmina.

Reproducibilidad del ensayo. El coeficiente de variación entre corridas fue de 1,1 %. Se observó linealidad en el intervalo de concentración.

El intervalo de referencia para el factor de simetría de albúmina fue de 0,69 -0,92.

Las muestras de suero carbamilado *in vivo* mostraron cambios similares. La Figura 3 y la Tabla 1 comparan la simetría de los picos de albúmina entre los controles y los diversos estadios de CKD.

Tabla 2: Representación de la mediana, máximo y mínimo del factor de simetría en controles sanos y en diversos estadios de la enfermedad renal crónica

	Mediana	Máximo	Mínimo
CONTROLES (n = 39)	0,824	0,921	0,683
CKD 2 (n = 20)	0,807	0,904	0,628
CKD 3A (n = 21)	0,751	0,845	0,679
CKD 3B (n = 21)	0,723	0,813	0,553
CKD 4 (n = 21)	0,676	0,914	0,530

Pacientes en hemodiálisis UZ GENT (n = 73)	0,644	0,880	0,345
Pacientes en hemodiálisis AALST (n = 47)	0,602	0,822	0,342

5

En el grupo completo, la asimetría del pico de albúmina se correlacionó bien con la concentración promedio de urea sérica (y (factor de simetría; %) =  $-0,001948 \times (\text{concentración promedio de urea sérica}) + 0,828$ ;  $r = 0,575$ ,  $p < 0,0001$ ). Se encontró una correlación similar con la creatinina sérica, (y (factor de simetría; %) =  $-0,02569 \times (\text{concentración promedio de creatinina sérica}) - 0,0257$ ;  $r = 0,652$ ,  $p < 0,0001$ ).

10

La correlación con KT/V fue más bien pobre: (y (factor de simetría; %) =  $-0,061 \times (\text{stdKT/V}) + 0,416$ ;  $r = 0,242$ , n.s.). El stdKT/V se considera generalmente como un pobre marcador para evaluar la eficiencia de la diálisis

15

El análisis de las características de funcionamiento del receptor (ROC) mostró un área bajo la curva (AUC) de 0,916 (CI del 95 %: 0,873 - 0,948) para el diagnóstico del estadio 2 de CKD.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para monitorear la enfermedad renal en un sujeto, que comprende someter una muestra de suero que comprende albúmina a partir de ese sujeto a electroforesis, en donde la albúmina carbamilada se usa como un marcador biológico para el monitoreo de la enfermedad renal, en donde el monitoreo comprende determinar la relación de simetría del pico de albúmina sérica de electroforesis.
- 10 2. Un método para evaluar la gravedad de la enfermedad renal mediante la determinación de la relación de simetría del pico de albúmina sérica en un ensayo de electroforesis.
- 15 3. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la enfermedad renal es una enfermedad renal en estadio terminal.
- 20 4. Un método para determinar la cantidad relativa de albúmina sérica carbamilada con respecto a la albúmina sérica nativa mediante electroforesis, sobre la base de la relación de simetría del pico de albúmina sérica de electroforesis.
- 25 5. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha electroforesis se lleva a cabo mediante el uso de un tampón de separación que comprende borato, dicho tampón tiene un pH en el intervalo de 8 a 11.
- 30 6. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha electroforesis se lleva a cabo mediante el uso de un tampón de separación que tiene un pH en el intervalo de pH 9,3 a 10,7.
- 35 7. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra es una muestra de suero sanguíneo.
- 40 8. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la electroforesis es electroforesis capilar.
- 45 9. Un método de conformidad con la reivindicación 8, en donde la medición tiene lugar en un capilar de sílice fundida.
- 50 10. El uso de electroforesis, preferentemente, electroforesis capilar, con mayor preferencia, electroforesis capilar mediante el uso de un tampón de separación como se define en la reivindicación 5 o 6, para determinar la cantidad absoluta o relativa de albúmina sérica carbamilada en un fluido biológico, basado en la relación de simetría del pico de albúmina sérica.
- 55 11. Un sistema para la determinación de albúmina sérica carbamilada, dicho sistema comprende:
  - un sistema de electroforesis, preferentemente, un sistema de electroforesis capilar;
  - medios de computación adaptados para calcular la simetría del pico de albúmina sérica de electroforesis;
  - medios de salida para suministrar la salida del cálculo y/o la determinación de albúmina sérica carbamilada en base a la relación de simetría.
12. Un sistema de conformidad con la reivindicación 11, en donde los medios de computación comprenden una computadora provista de algoritmos de programas informáticos apropiados.
13. Un sistema de conformidad con la reivindicación 11 o 12, en donde los medios de salida comprenden una pantalla de salida, impresora o cualquier otro dispositivo para la comunicación con el usuario del sistema.
14. Un sistema de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11- 13, en donde el sistema es un sistema portátil.
15. Un sistema de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11 - 14, en donde el sistema comprende, además, un generador para una señal de alarma que se activa si la relación de simetría alcanza un valor umbral predeterminado.

Figura 1

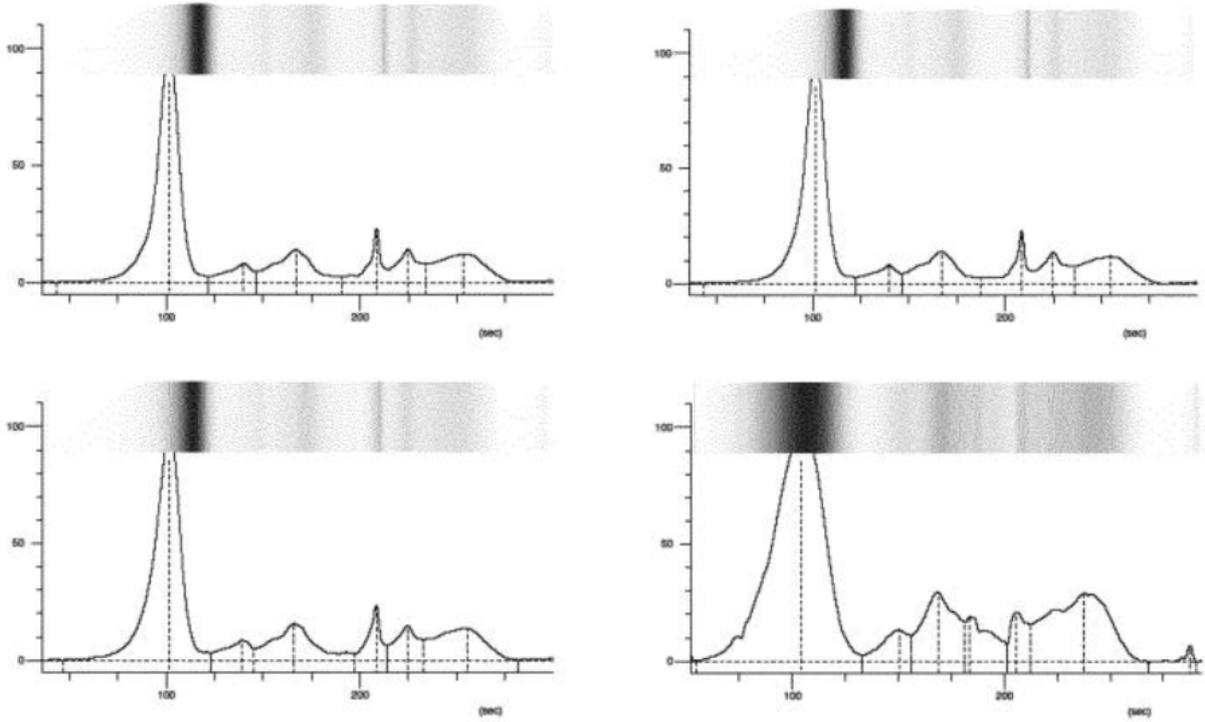


Figura 2

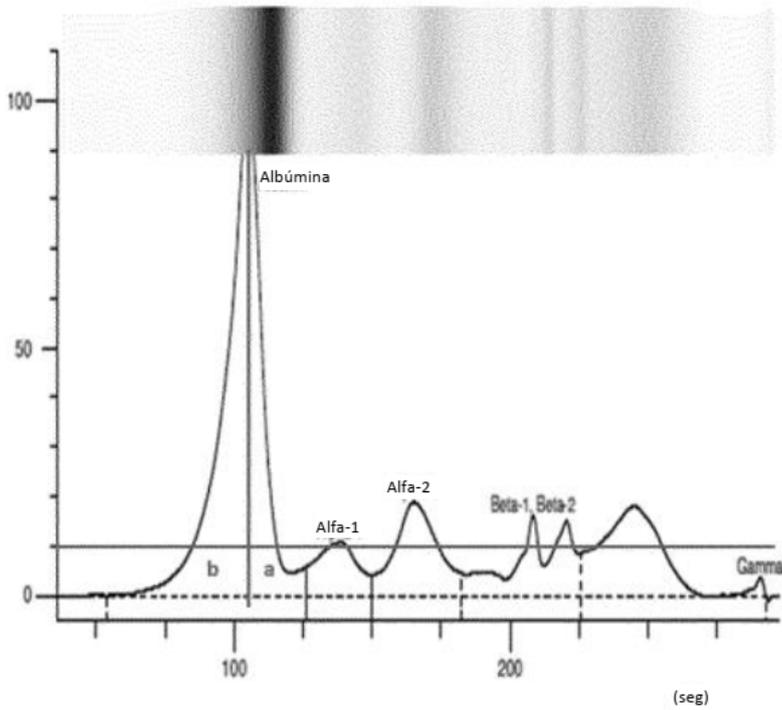


Figura 3

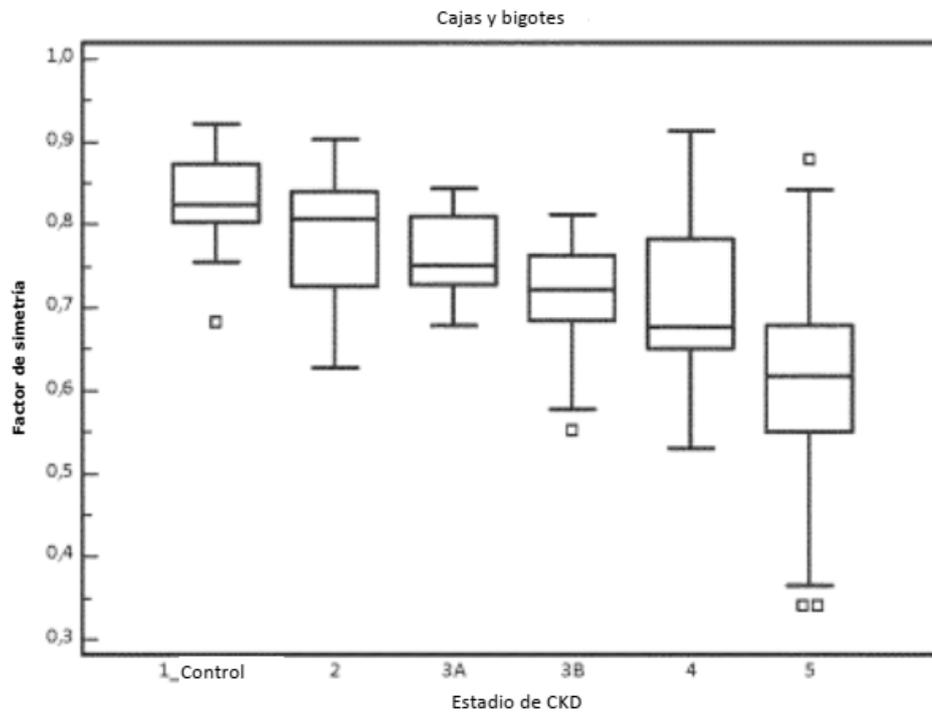


Figura 4

