

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 755**

21 Número de solicitud: 201131506

51 Int. Cl.:

C12Q 1/25 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

16.09.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.05.2013

Fecha de la concesión:

12.03.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

19.03.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (90.0%)
Plaza de San Diego, s/n.
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES;
FIBHGM: FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL GREGORIO
MARAÑÓN (5.0%) y
FUNDACIO PUIGVERT (5.0%)**

72 Inventor/es:

**BOSCH MARTÍNEZ, Ricardo;
ORTEGA DE MUES, Arantxa;
BOVER SAN JUAN, Jordi;
LÁZARO FERNÁNDEZ, Alberto y
TEJEDOR JORGE, Alberto**

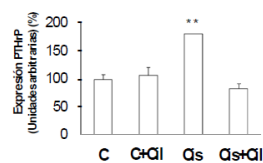
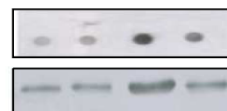
74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE INSUFICIENCIA RENAL.**

57 Resumen:

La presente invención describe un método de diagnóstico de Insuficiencia Renal que comprende determinar la cantidad de PTHrP presente en una muestra de orina de un sujeto, comparar dicha cantidad con al menos un valor de referencia y diagnosticar IR en dicho sujeto a partir de la comparación anterior. La determinación de la cantidad de PTHrP puede realizarse mediante un ensayo de transferencia Western o un Dot Blot. Establece la PTHrP como biomarcador para el diagnóstico de Insuficiencia Renal en todas las variedades de la enfermedad.



**p<0,05 vs resto de condiciones

Fig. 1a

ES 2 403 755 B1

DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico de insuficiencia renal

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención describe un método de diagnóstico de Insuficiencia Renal (IR) en cualquiera de sus formas clínicas en una muestra de orina de un mamífero, preferiblemente humano. Tiene aplicación en las terapias a aplicar para IR y patologías asociadas, en el campo de la medicina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 La enfermedad renal puede ser aguda o crónica y ambas progresan a Insuficiencia Renal (IR) y muerte en último término. En las últimas décadas se ha producido un aumento en rango epidémico de la incidencia de Insuficiencia Renal Crónica (IRC) más acusado en los países desarrollados. La IRC conlleva la pérdida de la función fisiológica del riñón, conocida propiamente como insuficiencia renal. La forma aguda de presentación de la insuficiencia renal se denomina Fracaso Renal Agudo (FRA). La pérdida de la función renal se caracteriza, desde el punto de vista bioquímico, por la uremia o retención de productos nitrogenados o urea en la sangre. Ambas formas de insuficiencia renal pueden tener múltiples causas así como un curso y pronóstico muy variables.

- 15 No existen terapias eficientes contra el FRA. En pacientes hospitalizados es una de las principales fuentes de morbilidad y mortalidad complicando el curso del 5% de las admisiones hospitalarias y el 30% de los ingresos en las unidades de cuidados intensivos. La incidencia anual de FRA supera los 400 casos por millón de población de los cuales más de 130 requieren tratamiento sustitutivo de la función renal.

- 20 La clave diagnóstica en la técnica de la IR es la elevación sanguínea en la concentración de urea y, de forma más específica, de la creatinina. Sin embargo en los últimos años se ha puesto de manifiesto que estos parámetros pueden tardar días en subir y retrasar por tanto el diagnóstico y tratamiento del FRA. Esto se debe a que tanto la urea como la creatinina son fundamentalmente marcadores de la filtración glomerular renal y no tanto de la función del túbulo renal, que es la zona del riñón más comúnmente afectada en el FRA (P.T. Murray, P. Palevsky, "Acute Kidney Injury and Critical Care Nephrology". 2009. NephroSAP 8: 173). Otro inconveniente que plantean es la necesidad de realizar una extracción de sangre del paciente para el diagnóstico.

- 25 Es por ello que en años recientes se ha intensificado la búsqueda e identificación de nuevas moléculas biomarcadoras de IR, de forma particular en orina. Actualmente se han reconocido diversas moléculas como biomarcadores, la mayor parte de las cuales están aún en plena fase de investigación obteniendo sus resultados más representativos cuando se utilizan de forma conjunta (W.K. Han et al. "Urinary biomarkers in the early detection of acute renal failure after cardiac surgery". 2009. Clinical Journal of the American Society of Nephrology 4: 873). Existe por tanto la necesidad de desarrollar nuevos marcadores biológicos que permitan el diagnóstico precoz de enfermedad renal, tanto de IRC como de FRA, aún antes de la aparición de los trastornos funcionales en que se basan los principales métodos diagnósticos disponibles en la actualidad.

- 30 En este sentido, la solicitud internacional WO 2008/089936 A1 describe los marcadores FGF23 (fibroblast growth factor) y adiponectina para la detección de IRC en una muestra biológica de pacientes. Tanto FGF-23 como adiponectina aumentan en forma sensible y específica su nivel en plasma a medida o como consecuencia de que disminuye la función renal y, por tanto, están inversamente relacionados con ella. Aunque se cita como muestra biológica no se aporta la determinación o cuantificación en orina de estos biomarcadores, de modo que sólo queda certificada su presencia en plasma sanguíneo.

- 35 Como biomarcadores de FRA han sido identificados: KIM-1 (Urinary kidney molecule-1), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo, N-acetil-β-d-glucuronidasa, L-FABP (liver fatty acid-binding protein), interleuquina-18, Cistatina C etc. El gran inconveniente de todos ellos es la necesidad de normalizar la excreción urinaria de los biomarcadores con la excreción propia de creatinina. Dado que el nivel de creatinina es muy variable en FRA existe el riesgo potencial de subestimar o sobrestimar los valores de excreción de los biomarcadores (S.S. Waikar, V. S. Sabbiseti, J.B. Bonventre: Normalization of urinary biomarkers to creatinina during changes in glomerular filtration rate. Kidney International 78:486, 2010). Aunque el conocimiento de estas moléculas representa un gran avance en la fisiopatología del FRA, queda aún por demostrar el valor exacto que representan en su diagnóstico precoz, esto es, antes de la presencia de alteraciones funcionales y del consiguiente aumento de urea y creatinina séricos. (S.G. Coca, R. Yalavarthy, J. Concato, C.R. Parikh: Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: A systemic review. Kidney International 73:1008, 2008).

La Hormona Paratiroidea (PTH) es una hormona clásica que juega un papel central en la regulación del metabolismo del calcio y del fósforo. Menos se sabe acerca del papel fisiológico de la Proteína relacionada con la Hormona Paratiroidea (PTHrP), la proteína biomarcadora de la invención, que fue identificada por primera vez en 1987 como el agente responsable de la hipercalcemia maligna.

5 La PTHrP consta de 141 residuos aminoacídicos, de los cuales los primeros 13 presentan un 70% de homología con la correspondiente secuencia de la hormona PTH. Aunque la PTHrP y la PTH son expresadas por genes diferentes, ambas proteínas interactúan con el receptor común PTH/PTHrP en hueso y riñón, también llamado receptor PTH/PTHrP "tipo 1" o clásico. Este hecho se traduce en la evidente repercusión clínica de la similitud de patologías que de ello se derivan, como son la hipercalcemia maligna y el hiperparatiroidismo primario. Por otra parte, se sabe que la PTHrP debido a cambios post transcripcionales puede dar origen a diferentes fragmentos cuya actividad biológica no ha sido aún completamente estudiada. A pesar de que estos fragmentos presentan acciones similares sobre hueso y riñón, existen algunas diferencias en sus actividades biológicas.

10 En contraste con situaciones patológicas como la hipercalcemia humoral maligna en la que la PTHrP desempeña el papel de la PTH, bajo circunstancias de salud del paciente la PTHrP juega predominantemente un papel paracrino y/o autocrino. Entre sus funciones fisiológicas deben destacarse: 1) la regulación del tono muscular en sistema vascular, intestinal, uterino y vesicular; 2) la regulación del transporte de calcio transepitelial en riñón, placenta, ovarios y glándulas mamarias, y 3) la regulación del desarrollo de órganos y tejidos, así como su diferenciación y proliferación (Philbrick, W.M. et al., "Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology". 15 1996. Physiological Reviews, 76, 127-173).

A pesar de la amplia producción de PTHrP en individuos sanos su concentración plasmática es apenas detectable por los ensayos clínicos habituales, mucho menos en orina. Nunca se ha descrito la función de la proteína como biomarcador, y en particular nunca de patologías relacionadas con la insuficiencia renal.

20 El problema que se presenta por tanto en la técnica es encontrar un biomarcador para el diagnóstico de IRC y FRA en un paciente, que evite la extracción invasiva de la muestra biológica necesaria y que ofrezca un valor de diagnóstico previo a los síntomas de dichas enfermedades. La solución propuesta por la presente invención es la determinación de la PTHrP presente en una muestra de orina de un paciente de IR.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

25 La invención describe el diagnóstico de insuficiencia renal, aguda o crónica, mediante la cuantificación urinaria de la PTHrP. La PTHrP es normalmente indetectable en fluidos orgánicos de un individuo sano, de forma que su mera presencia ya sirve de marcador de la enfermedad. El hallazgo de un valor aumentado de PTHrP urinario en comparación al valor hallado en sujetos sanos resulta un biomarcador indicativo de insuficiencia renal, aguda o crónica. Dado que el procedimiento descrito en la presente invención sólo requiere el análisis de una muestra aislada de orina, hace posible realizar el diagnóstico de insuficiencia renal aguda o crónica en muestras aisladas de 30 orina de pacientes o en muestras únicas, e incluso en muestras de orina antiguas permitiendo el diagnóstico retrospectivo aún en ausencia de suero o plasma.

35 La presente invención es por tanto un método de diagnóstico de IR, que comprende determinar la cantidad de PTHrP presente en una muestra de orina de un sujeto, comparar dicha cantidad con al menos un valor de referencia y diagnosticar IR en dicho sujeto a partir de la comparación anterior.

40 El método más viable se basa en analizar muestras de orina mediante la técnica de Transferencia Western de proteínas, utilizando un anticuerpo monoclonal específico que reconoce la Proteína relacionada a la Parathormona (PTHrP). La presencia de una banda única, además de demostrar la especificidad de la metodología empleada, permite utilizar una técnica de detección más sencilla como es el dot blot. De forma que una realización preferible de la invención es que el método de dicha determinación de la cantidad de PTHrP en orina comprenda un ensayo de transferencia western o un ensayo dot blot.

Para cuantificar el análisis anterior, una realización preferible del método de la invención es que dicho valor de referencia esté obtenido a partir de una muestra control.

45 Otra realización preferible es que el sujeto del que se toma la muestra de orina sea un mamífero, más preferiblemente un humano.

50 El biomarcador descrito en la presente invención presenta dos ventajas clínicas principales con respecto a otros biomarcadores conocidos. En primer lugar, el método solo requiere el análisis de una muestra aislada de orina para hacer posible el diagnóstico de IR. En segundo lugar, mientras que la utilidad diagnóstica de los biomarcadores conocidos en orina está limitada a FRA, la presente invención permite además el diagnóstico de IRC. De modo que otra realización preferible es que dicha IR sea FRA o IRC o patologías asociadas, más preferiblemente una IRC secundaria a nefropatía diabética, nefroangioesclerosis o glomerulonefritis.

Otra realización preferible es el uso de la medición de la cantidad de PTHrP en orina para preparar un producto farmacéutico útil para el diagnóstico de IR en un sujeto.

Otra realización más de la invención es un método de obtener información de carácter predictivo o diagnóstico de IR, que comprende la etapa de medir la cantidad de la PTHrP en una muestra de orina de un paciente, dicha cantidad de PTHrP proveyendo dicha información de carácter predictivo.

5 Otra realización es un método para la predicción de IR en un sujeto sospechoso de sufrir IR, en el que dicho método comprende la etapa de determinar los niveles de expresión de la PTHrP en una muestra de orina de dicho sujeto.

10 La realización más preferible de la invención es un kit para el diagnóstico de IR, que comprende los reactivos necesarios para determinar la cantidad de PTHrP en una muestra de orina de un sujeto preferiblemente humano, instrucciones de uso de dichos reactivos y un dispositivo para determinar si el resultado de dicha cuantificación de PTHrP es indicativo de diagnóstico positivo de IR en dicho sujeto.

15 Otra realización muy preferible es un kit para realizar un método de diagnóstico de IR que comprende determinar la cantidad de PTHrP presente en una muestra de orina de un sujeto preferiblemente humano, comparar dicha cantidad con al menos un valor de referencia y diagnosticar IR en dicho sujeto a partir de la comparación anterior, donde dicho kit comprende los reactivos necesarios para cuantificar la cantidad de PTHrP en una muestra de orina de un sujeto y permite la comparación del resultado de dicha cuantificación con un estándar predeterminado.

Ensayos hechos en la orina de distintos roedores confirman la idoneidad de la PTHrP como marcador de enfermedad renal. En la presente invención se ha detectado de PTHrP en ratones inducidos de FRA con cisplatino.

20 El cisplatino es un agente quimioterapéutico eficaz en una gran variedad de tumores sólidos, especialmente en neoplasias genitourinarias y de ovario. Sin embargo, la lesión renal es uno de los efectos tóxicos predominantes de este compuesto. Produce vasoconstricción y se concentra en la corteza del riñón donde lesiona el segmento S3 del túbulo proximal. Se elimina también por vía renal, por lo que alcanza en la orina concentraciones mayores que en otros fluidos orgánicos. Existen numerosos estudios sobre la nefrotoxicidad inducida por el cisplatino y es un reconocido modelo experimental para el estudio del FRA.

25 En los siguientes ejemplos se muestra que los animales con FRA inducido por cisplatino mostraron un aumento estadísticamente significativo de la PTHrP urinaria. Por el contrario, los animales que recibieron cisplatino y el protector renal cilastatina mostraron una disminución significativa de la excreción urinaria de PTHrP. El hallazgo de un valor aumentado de PTHrP urinario en relación al valor hallado en sujetos controles normales es un biomarcador válido indicativo de insuficiencia renal aguda o crónica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 **Figura 1a:** Ensayos Dot Blot (superior) y Transferencia Western (inferior) representativos de la expresión de PTHrP urinaria en roedores controles normales y en animales con FRA experimental inducido por cisplatino, estos últimos con y sin tratamiento con cilastatina. Se añade el correspondiente análisis densitométrico de cuantificación media de las muestras de todos los ratones ensayados.

35 C, control de roedores normales; C+Cil, animales controles tratados con cilastatina; Cis, animales con FRA experimental inducido por cisplatino; Cis+Cil, animales que recibieron Cis y fueron tratados con cilastatina.

Figura 1b: Concentración de creatinina plasmática correspondiente a los animales con FRA correspondientes a la Fig. 1a.

Figura 2a: Transferencia Western representativa de la expresión de PTHrP urinaria en ratones con FRA (N=12) con su correspondiente análisis densitométrico de cuantificación media de las muestras ensayadas.

40 C, excreción urinaria de PTHrP en sujetos controles normales; D0-7, días transcurridos tras el FRA.

Figura 2b: Concentración de creatinina plasmática correspondiente a los ratones con fracaso renal agudo correspondientes a la Fig. 2a.

Figura 3a: Transferencia Western de la expresión de PTHrP urinaria en sujetos controles normales y en pacientes con IRC representativos de las distintas enfermedades renales estudiadas.

45 C, Control; ND, Nefropatía Diabética; ON, Otras Nefropatías; NA, Nefroangioesclerosis; GN, Glomerulonefritis.

Figura 3b: Concentración de creatinina plasmática correspondiente a los pacientes con nefropatías crónicas e IRC.

MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. Diseño de los modelos de la enfermedad en roedor.

Se realizó un modelo experimental animal de FRA in vivo de toxicidad renal generada por el quimioterápico cisplatino, en presencia del nefroprotector cilastatina.

5 Para la realización del modelo experimental de FRA se utilizaron ratas Wistar (WKY) macho de un peso medio de 260 ± 15 g, y una edad media de 7-8 semanas. Toda la manipulación de los animales se llevó a cabo según la normativa legal vigente recogida en el Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre. El estudio duró 5 días a partir de la administración intraperitoneal del cisplatino (en los grupos cisplatino y cisplatino + cilastatina), o su vehículo suero salino (en los grupos control y control + cilastatina), coadministrándose a partir de ese momento y cada 12 horas cilastatina (en los grupos control + cilastatina y cisplatino + cilastatina), o su vehículo suero salino (a los grupos cisplatino y control). Durante todo el período, los animales tuvieron libre acceso tanto al agua como a la comida con dieta estándar en un ambiente controlado de luz, temperatura y humedad. Un día antes del sacrificio, los animales fueron introducidos en jaulas metabólicas para recoger la orina de 24 horas con la finalidad de cuantificar la diuresis y la concentración de proteínas. Se utilizaron en total 32 animales que fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos con un tamaño muestral n=8 animales por grupo. Se estudiaron dos muestras aisladas de orina recogida durante 24h. Todos los parámetros se han analizado por duplicado. Así pues, los grupos de estudio y sus regímenes de tratamiento fueron los siguientes:

20 ✓ Grupo cisplatino + cilastatina (n=8): animales tratados con administración única intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg peso) disuelto en suero salino (vehículo del cisplatino), más cilastatina disuelta en suero salino (vehículo de cilastatina) a dosis de 75 mg/Kg de peso cada 12 horas intraperitonealmente desde el momento de administración del cisplatino y hasta el día del sacrificio.

✓ Grupo cisplatino (n=8): animales con administración única intraperitoneal de cisplatino (5 mg/Kg peso animal) disuelto en suero salino (vehículo del cisplatino), más el vehículo de la cilastatina (suero salino) cada 12 horas en los mismos volúmenes y regímenes que los grupos tratados con cilastatina.

25 ✓ Grupo control + cilastatina (n=8): animales tratados con administración única intraperitoneal de suero salino (vehículo del cisplatino) en el mismo volumen que los grupos tratados con cisplatino, más cilastatina (disuelta en suero salino) a dosis de 75 mg/Kg peso animal cada 12 horas intraperitonealmente desde el momento de administración del suero salino (vehículo del cisplatino) y hasta el momento del sacrificio.

✓ Grupo control (n=8): animales tratados con suero salino en los mismos volúmenes y regímenes que en los grupos tratados con cisplatino y/o cilastatina.

30 En el momento del sacrificio, los animales fueron pesados y posteriormente anestesiados con ketamina (10 mg/kg) y diazepam (4 mg/kg). Una vez anestesiados se les extrajo la sangre mediante canulación de la aorta abdominal a la altura de la bifurcación. La cuantificación de la función renal se realizó mediante la determinación de creatinina en sangre y orina de 24h por el método cinético del picrato alcalino (Larsen K. "Creatinin assay in the presence of protein with LKB 8600 reaction rate analyser". Clin Chim Acta 1972; 38: 475-6) obteniéndose el cálculo del aclaramiento plasmático de creatinina.

Ejemplo 2. Determinación de la PTHrP en la orina mediante Western

40 Se tomaron 5µl de orina y se separaron en un gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El resultado se transfirió a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Lab, Hercules, CA, EEUU). El bloqueo de antígenos inespecíficos se realizó 1h a 37°C con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% en TBS (Tris 100mM, NaCl 150 mM pH 7,5) con Tween-20 al 0,05% (TTBS). A continuación las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos específicos para la PTHrP (dilución 1:1000) (Sigma Co, St Louis, MO, EEUU). Pasado ese tiempo se realizaron lavados sucesivos de la membrana. Se realizó una segunda incubación con una IgG anti-ratón (dilución 1:5000) conjugada con peroxidasa y se reveló por quimioluminiscencia (Sistema ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, RU). Las bandas correspondientes del fluorograma se cuantificaron por densitometría mediante el programa Imagen J. Figura 1, primer panel.

Ejemplo 3. Determinación de la PTHrP en la orina mediante Dot Blot

50 Se pretataron membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) con solución (25mM Tris, 192mM glicina, pH 8,3) y 20% metanol durante 5 minutos y se insertaron en Bio-Dot-Blot (Bio.Rad). Se cargaron entonces 50 µl de muestra de orina en pocillo (x4) y se dejó absorber la muestra en vacío durante 20 minutos. Una vez absorbida la muestra se retiró la membrana y se tiñó con rojo Ponceau S para detectar las proteínas presentes. Se lavaron las membranas con Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 (TBS) con Tween-20 al 0,05% (TTBS) durante 2 minutos. Para bloquear las inespecificidades se trataron durante 1 h a 37°C con BSA al 5% en TTBS. Se incubaron entonces toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal anti-PTHrP (1: 500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Transcurrido ese tiempo se lavaron con TTBS 2 veces durante 5 minutos y se incubaron con IgG anti-conejo conjugadas con peroxidasa (1:2000) en 5% de leche descremada en TTBS. El resultado se reveló por

quimioluminiscencia (Sistema ECL, Amersham). Las bandas correspondientes del fluorograma se cuantificaron por densitometría. Figura 1, primer panel.

Ejemplo 4. Cuantificación de la expresión de PTHrP urinaria en roedores controles normales y en animales con FRA experimental inducido por cisplatino (Cis) con y sin tratamiento con cilastatina (Cil)

5 Se centrifugaron las muestras para eliminar sobrenadantes y se procedió a realizar la cuantificación semicuantitativa de PTHrP urinario de acuerdo a las técnicas de transferencia western y dot blot descritas en los ejemplos 2 y 3. Los resultados estadísticos se obtuvieron por ANOVA, seguido de una prueba post-hoc (Scheffé, Dunn etc.), o la t de Student (o la prueba de Mann-Whitney), para muestras no pareadas, según los casos. Se consideró significativa una $p < 0,05$.

10 **Ejemplo 5. Valoración de la función renal mediante la determinación urinaria de PTHrP en roedor, en Dot Blot**

15 En los animales estudiados (N=8) por grupo de animales, animales totales, controles y FRA por cisplatino, N=32) se observó una correlación negativa (con significación estadística, Rho de Spearman, $p < 0,05$) entre la concentraciones urinarias de PTHrP, el aclaramiento de plasmático de creatinina y la excreción urinaria de creatinina. Además, se observó una correlación positiva (con significación estadística, Rho de Spearman $p < 0,05$) entre la concentración urinaria de PTHrP y la concentración plasmática de creatinina (Figura 1, segundo panel: creatinina plasmática en todos los grupos de animales estudiados, sobre los cuales se ha determinado el análisis estadístico de la Rho de Spearman). La concentración urinaria de PTHrP se correlaciona así de forma estadísticamente significativa con la función renal.

20 **Ejemplo 6. PTHrP como biomarcador de Fracaso Renal Agudo FRA en humanos**

25 Se utilizaron muestras de pacientes procedentes del Biobanco del Hospital Ramón y Cajal (n=12). Los controles fueron sujetos sanos sin antecedentes de enfermedad renal, hipertensión, diabetes ni otras enfermedades que afectan al riñón. En los estudios se utilizaron hombres y mujeres caucásicos desde 20 a 70 años de edad. Los pacientes fueron tratados en unidades de cuidados intensivos y sometidos a un riguroso y exhaustivo estudio clínico realizándose los análisis bioquímicos así como estudios complementarios de diagnóstico tales como técnica de imágenes, endoscópicas y procedimientos quirúrgicos siguiendo los protocolos habituales del procedimiento médico. La enfermedad renal se detectó específicamente mediante el estudio de la función renal según la concentración de creatinina plasmática el método cinético del picrato alcalino según referenciado en el Ejemplo 1, donde los valores superiores a 1,4 mg/dl se consideraron anómalos. Los pacientes con FRA incluyeron los siguientes grupos de
30 pacientes: pacientes con FRA pre-renal de origen séptico (n=6) y pacientes con FRA establecido con necrosis tubular (n=9). La figuras 2a y 2b muestran el aumento significativo en la excreción urinaria de PTHrP tras el FRA.

Ejemplo 7. PTHrP como biomarcador de enfermedad renal e Insuficiencia Renal Crónica IRC en humanos, por transferencia western

35 La determinación de PTHrP se realizó según el procedimiento descrito en el ejemplo 2. La figura 3a muestra un análisis semicuantitativo (densitometría de la transferencia western) de PTHrP urinario en pacientes con IRC de distintas etiologías procedentes del biobanco RedinRen. Mientras que la figura 3b muestra los valores de creatinina sérica según el método cinético del picrato alcalino según referenciado en el Ejemplo 1, de los pacientes de la figura 3a.

REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnóstico de IR, que comprende:
 - determinar la cantidad de PTHrP presente en una muestra de orina de un sujeto,
 - comparar dicha cantidad con al menos un valor de referencia, y
 - diagnosticar IR en dicho sujeto a partir de la comparación anterior.
2. Método según la reivindicación 1, en que dicha determinación de la cantidad de PTHrP comprende un ensayo de transferencia western o un ensayo dot blot.
3. Método según las reivindicaciones 1 ó 2, en que dicho valor de referencia está obtenido a partir de una muestra control.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que dicho sujeto es un mamífero.
5. Método según la reivindicación 4, en que dicho mamífero es un humano.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que dicha IR es FRA o IRC, o patologías asociadas.
7. Método según la reivindicación 6, en que dicha IRC es una IRC secundaria a nefropatía diabética, nefroangioesclerosis o glomerulonefritis.
8. Uso de la medición de la cantidad de PTHrP en orina para la preparación de un producto farmacéutico útil para el diagnóstico de IR en un sujeto.
9. Un kit para el diagnóstico de IR, que comprende los reactivos necesarios para determinar la cantidad de PTHrP en una muestra de orina de un sujeto, instrucciones de uso de dichos reactivos y un dispositivo para determinar si el resultado de dicha cuantificación de PTHrP es indicativo de diagnóstico positivo de IR en dicho sujeto.
10. Un kit para realizar un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende los reactivos necesarios para cuantificar la cantidad de PTHrP en una muestra de orina de un sujeto y que permite la comparación del resultado de dicha cuantificación con un estándar predeterminado.
11. Kit según una de las reivindicaciones 9 ó 10, en que dicho sujeto es un humano.

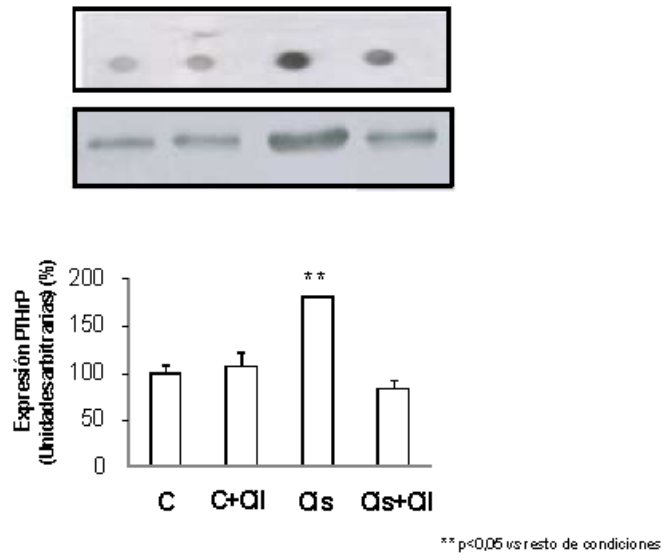


Fig. 1a

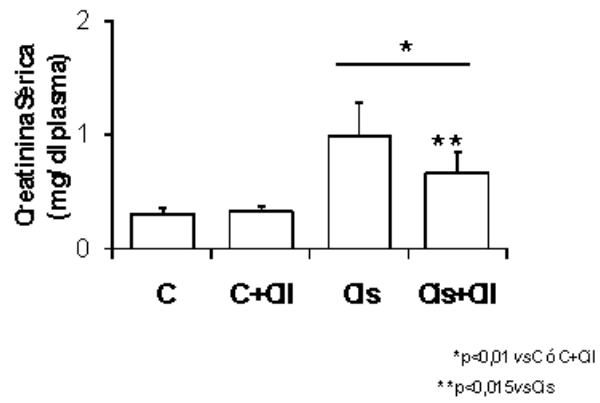


Fig. 1b

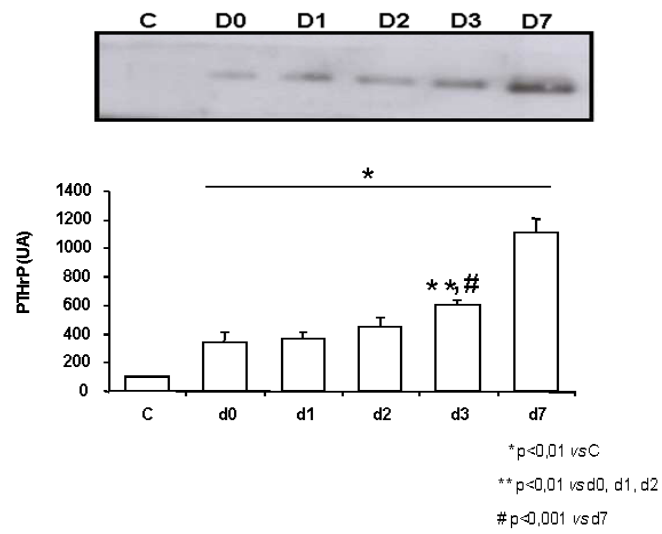


Fig. 2a

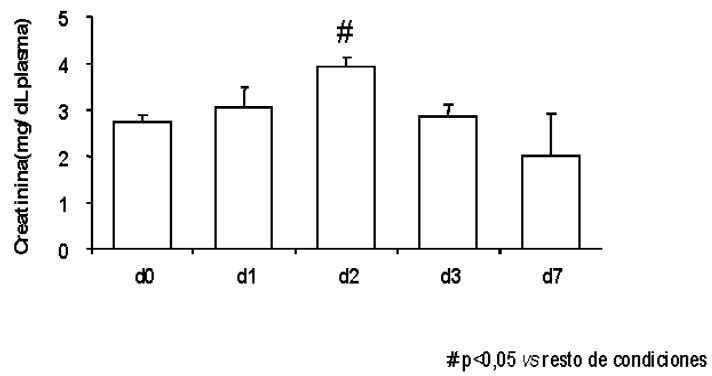


Fig. 2b

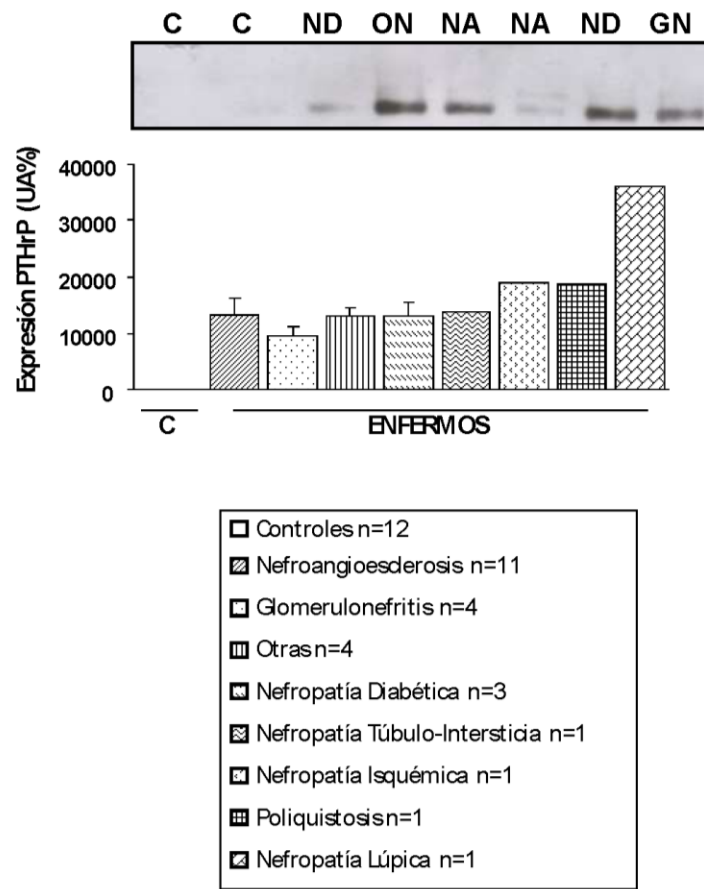


Fig. 3a

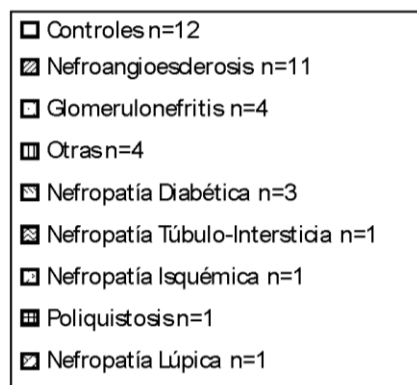
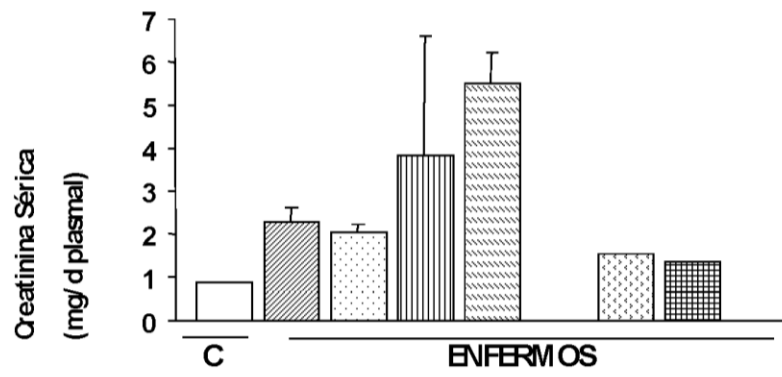


Fig. 3b



- ②① N.º solicitud: 201131506
②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.09.2011
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/25** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BOSCH, R.J. et al., 'A transgenic mouse model for studying the role of the parathyroid hormone-related protein system in renal injury', JOURNAL OF BIOMEDICINE & BIOTECHNOLOGY, 2011, Article No.: 290874, ISSN: 1110-7243, doi: 10.1155/2011/290874. Epub: 31.10. 2010, todo el documento.	1-11
A	ORTEGA, A. et al., 'Role of the renin-angiotensin system on the parathyroid hormone-related protein overexpression induced by nephrotoxic acute renal failure in the rat.', JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, 2005, Vol. 16, No. 4, páginas 939-949, ISSN: 1046-6673, todo el documento.	1-11
A	ORTEGA, A. et al., 'Role of parathyroid hormone-related protein in tubulointerstitial apoptosis and fibrosis after folic acid-induced nephrotoxicity.', JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, 2006, Vol. 17, No. 6, páginas 1594-1603, ISSN: 1046-6673, todo el documento.	1-11
A	LARGO, R. et al., 'Renal expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor in a rat model of tubulointerstitial damage.', KIDNEY INTERNATIONAL, 1999, Vol. 55, No. 1, páginas 82-90, ISSN: 0085-2538, todo el documento.	1-11
A	SANTOS, S. et al., 'Up-regulation of parathyroid hormone-related protein in folic acid-induced acute renal failure.', KIDNEY INTERNATIONAL, 2001, Vol. 60, No. 3, páginas 982-995, ISSN: 0085-2538, todo el documento.	1-11
A	FIASCHI-TAESCH, N.M. et al., 'Prevention of acute ischemic renal failure by targeted delivery of growth factors to the proximal tubule in transgenic mice: the efficacy of parathyroid hormone-related protein and hepatocyte growth factor.', JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, 2004, Vol. 15, No. 1, páginas 112-125, ISSN: 1046-6673, todo el documento.	1-11
A	KLATTE, T. et al., 'Differential diagnosis of hypercalcemia in renal malignancy.', UROLOGY, 2007, Vol. 70, No. 1, páginas 179.e7-e8, ISSN: 0090-4295 (print), ISSN: 1527-9995 (electronic), todo el documento.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
14.02.2013

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/4

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.02.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BOSCH, R.J. et al., <i>J. Biomed. Biotechnol.</i> , (2011), Art. No: 290874.	31.10. 2010
D02	ORTEGA, A. et al., <i>J. Am. Soc. Nephrol.</i> , (2005), 16(4): 939-49.	2005
D03	ORTEGA, A. et al., <i>J. Am. Soc. Nephrol.</i> , (2006), 17(6): 1594-603.	2006
D04	LARGO, R. et al., <i>Kidney Int.</i> , (1999), 55(1): 82-90.	1999
D05	SANTOS, S. et al., <i>Kidney Int.</i> , (2001), 60(3): 982-95.	2001
D06	FIASCHI-TAESCH, N.M. et al., <i>J. Am. Soc. Nephrol.</i> , (2004), 15(1): 112-25.	2004
D07	KLATTE, T. et al., <i>Urology</i> , (2007), 70(1):179.e7-8.	2007

En D1-D7 se analiza la asociación entre la sobreexpresión de la Proteína relacionada con la Hormona Paratiroidea (PTHrP) y patologías renales.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un método para el diagnóstico de insuficiencia renal (IR) que comprende determinar la cantidad de PTHrP en una muestra de orina de un sujeto. En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D1-D7, no se ha divulgado ningún método para el diagnóstico de IR que comparta las mismas características técnicas del procedimiento reivindicado en la solicitud de patente. Además, dicho procedimiento no se deduce de una manera obvia combinando la información descrita previamente sobre este campo de la técnica.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-11 es nuevo y tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.