

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 028**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/92** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2005 E 18195687 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3489689**

54 Título: **Determinación de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) como marcador diagnóstico para trastornos renales**

30 Prioridad:

**20.12.2004 US 637503 P**

**21.09.2005 US 719307 P**

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

**09.04.2021**

73 Titular/es:

**ANTIBODYSHOP A/S (100.0%)**

**Grusbakken 8**

**2820 Gentofte, DK**

72 Inventor/es:

**UTTENTHAL, LARS OTTO;**

**JUANES, MARGARITA GHIGLIONE y**

**BANGERT, KRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 818 028 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

Determinación de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) como marcador diagnóstico para trastornos renales

5 Esta solicitud es una no provisional de las solicitudes provisionales de EE. UU. de n.ºs de serie 60/637.503, presentada el 20 de diciembre de 2004, y 60/719.307, presentada el 21 de septiembre de 2005.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de distinción entre una afección que no afecta al riñón, en donde la afección que no afecta al riñón es un trastorno inflamatorio, un trastorno infeccioso o un trastorno canceroso, y la probabilidad de un trastorno renal, en donde el trastorno renal se selecciona de insuficiencia renal aguda, necrosis tubular aguda y nefropatía tubulointersticial aguda, en un ser humano, comprendiendo dicho método las etapas de: i) 15 determinar la concentración de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) humana en una muestra de fluido corporal del ser humano, ii) comparar dicha concentración con un valor de corte predeterminado, dicho valor de corte se elige para excluir las concentraciones menores de NGAL asociadas con afecciones que no afectan al riñón, en donde una concentración por encima del valor de corte es indicativa de la probabilidad del trastorno renal.

20 **Antecedentes de la invención**

La detección de lesión isquémica renal que puede producir IRA, NTA o NTIA ha dependido hasta ahora de los signos clínicos, tales como oliguria y retención de líquidos, combinado con los resultados de análisis químicos en 25 sangre y orina que muestran una baja excreción de sodio, niveles de creatinina y urea en sangre aumentados y crecientes y, si se mide, una baja depuración de creatinina. Estos signos son indicativos de la presencia de la afección establecida. También se han analizado varios marcadores urinarios de daño tubular renal. De estos, alfa 1-microglobulina, beta 2-microglobulina (Penders y Delanghe, JR, 2004) y N-acetil-beta-D-glucosaminidasa (NAG) (Kotanko *et al.*, 2000) están aumentados en casos de NTA establecida, pero pueden aparecer solo 4 o 5 días después de la lesión isquémica o tóxica en animales experimentales. La molécula de lesión renal 1 (KIM-1) también 30 está aumentada en la orina de pacientes con NTA, pero la evolución temporal, aunque probablemente temprana, no se ha establecido en pacientes humanos (Han *et al.*, 2002). La proteína rica en cisteína 61 (CYR61) alcanza un máximo en orina de 6 a 9 horas después de la lesión isquémica en animales experimentales (Muramatsu *et al.*, 2002). Sin embargo, los niveles en seres humanos son todavía desconocidos. Otros marcadores que se han estudiado incluyen clusterina (Aulitzky *et al.*, 1992) y prostaglandina D-sintasa de tipo lipocalina (L-PGDS) (Tsuchida 35 *et al.*, 2004); su utilidad para el diagnóstico temprano o predicción de NTA aún no está clara. Como resultado de la evolución temporal en general lenta de la aparición de estas moléculas marcadoras en orina después de exponer el riñón a isquemia o agentes nefrotóxicos, no han entrado en el uso general para el diagnóstico temprano o trastornos renales inmediatos resultantes de estas lesiones.

La lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) también se conoce como lipocalina de neutrófilos (NL; 40 HNL en el caso de lipocalina de neutrófilos humana), lipocalina 2 (LCN2), proteína de 25 kDa relacionada con la alfa 2-microglobulina (en rata) o 24P3 (en ratón). En rata, también se ha denominado, lipocalina relacionada con neu (NRL), ya que su gen se sobreexpresa en tumores mamaros iniciados por el oncogén neu (HER2/c-erbB-2) (Stoesz y Gould, 1995). NGAL es una glucoproteína de 25 kDa aislada primero de los gránulos de leucocitos polimorfonucleares (Triebel *et al.*, 1992; Kjeldsen *et al.*, 1993). Contiene un puente disulfuro y forma una proporción 45 de dímeros y una proporción menor de trímeros. Está asociada con la colagenasa humana de tipo IV de neutrófilos de 92 kDa, también llamada metaloproteínasa de matriz 9 (MMP-9) o gelatinasa B, bien como monómero formando un complejo de aparentemente 115 kDa (Monier *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2001) o como dímero, formando un complejo de aparentemente 125 kDa (Yan *et al.*, 2001). Se han identificado estos complejos en la orina de pacientes 50 con una variedad de cánceres, incluyendo cánceres de la próstata, vejiga, riñón y mama.

NGAL se dio a conocer inicialmente como un marcador de activación de neutrófilos, que se libera a la sangre cuando los microorganismos invasores, en particular bacterias piógenas, causan la desgranulación de los neutrófilos 55 y la exocitosis de las proteínas de los gránulos. Como tal, se cree que la medida de los niveles elevados de NGAL en una muestra de plasma o suero de un ser humano es indicativa de que el individuo padece una inflamación, especialmente una producida por una infección bacteriana (Venge, 2000; patente de EE. UU. 6.136.526; solicitud PCT WO95/29404). A este respecto, pero en contradicción con su derivación específica de neutrófilos reivindicada, se identificó NGAL (24P3) como una proteína de fase aguda de tipo 1 en ratón, donde su expresión estaba principalmente localizada en el hígado durante la respuesta de fase aguda (Liu y Nilsen-Hamilton, 1995).

La solicitud de patente de EE. UU. 2004/0219603 describe el uso de NGAL como un biomarcador en orina para 60 detectar el inicio temprano de la lesión celular tubular renal. Sin embargo, no se describe si o cómo se puede distinguir la lesión celular tubular renal de la inflamación sistémica o infección bacteriana como la causa del nivel elevado de NGAL.

65 **Sumario de la invención**

Se ha encontrado ahora de forma sorprendente que los niveles de NGAL debidos a lesión renal en general son más altos que los niveles de NGAL producidos por afecciones inflamatorias, infecciosas o cancerosas que no afectan a la función renal. Esto ha permitido el establecimiento de métodos para el diagnóstico y/o seguimiento de un trastorno renal en un paciente que distingue trastornos renales de otros trastornos que no afectan al riñón. Mediante trastorno renal se quiere decir cualquier alteración de la función, incluyendo las correlaciones estructurales y ultraestructurales de esa alteración, bien del riñón como un todo o de una o más estructuras celulares de las que se compone, que va más allá de los mecanismos reguladores que mantienen el estado saludable normal. Ejemplos no exclusivos de tales trastornos incluyen afecciones asociadas con isquemia renal tales como necrosis tubular aguda (NTA) o nefropatía tubulointersticial aguda (NTIA), y también incluyen insuficiencia renal aguda (IRA) o insuficiencia renal crónica (IRC) de cualquier causa, glomerulonefritis aguda y crónica de cualquier causa, nefropatía debida a obstrucción urinaria, nefropatía debida a hipertensión, nefropatía asociada con pre-eclampsia o toxemia de embarazo, rechazo o enfermedad recurrente de un riñón trasplantado, así como enfermedades congénitas y neoplásicas del riñón.

Según esto, la presente divulgación proporciona métodos para el diagnóstico y/o seguimiento de lesión renal en seres humanos, que comprende medir un nivel de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) humana en una muestra de fluido corporal, preferiblemente orina, obtenida del paciente. Los niveles elevados de NGAL son indicativos de lesión renal si son mayores que los niveles menos elevados especificados de NGAL producidos en otros trastornos que no afectan necesariamente a la función renal, tales como afecciones inflamatorias o infecciosas o cánceres. De esta manera, en un primer aspecto, la presente divulgación se refiere a un método de diagnóstico, seguimiento o determinación de la probabilidad de un trastorno renal en un ser humano, en donde dicho método distingue entre un trastorno renal y otra afección que no afecta al riñón, comprendiendo dicho método las etapas de

- i) determinar la concentración de NGAL humana en una muestra de un fluido corporal del ser humano,
- ii) comparar dicha concentración con un valor de corte predeterminado, dicho valor de corte se elige para excluir las concentraciones menores de NGAL asociadas con afecciones que no afectan al riñón, en donde una concentración por encima del valor de corte es indicativa de un trastorno renal.

Además, la presente divulgación permite la distinción entre diferentes grados de trastorno renal. De esta manera, el método comprende una etapa adicional de comparar dicha concentración con un segundo valor de corte, dicho segundo valor de corte se elige para excluir concentraciones menores de NGAL asociadas con un menor grado de trastornos renales que es improbable que requieran tratamiento mediante diálisis, en donde una concentración por encima del valor de corte es indicativa de un trastorno más grave que es probable que requiera tratamiento por diálisis.

El análisis de otras moléculas marcadoras para lesión renal que pueden producir IRA, NTA o NTIA no ha entrado en el uso clínico de rutina, ya que estos otros marcadores aparecen en la orina demasiado tarde en el curso del desarrollo del trastorno renal para ser útiles en alertar al médico del desarrollo del trastorno o guiar medidas preventivas o terapéuticas. Este problema se ha resuelto mediante la presente invención que usa el análisis de NGAL en muestras humanas tal como orina para detectar el desarrollo de trastornos renales según las reivindicaciones.

Los estudios animales sugieren que este es el marcador más temprano de lesión renal que aparece en orina, con niveles en orina que aumentan a las 2 o 3 horas después del inicio de la lesión. El análisis de la NGAL en orina según la presente divulgación ofrece, por tanto, un método de detectar lesión renal que puede producir IRA, NTA o NTIA, distinguiéndola de otros trastornos, y, si la velocidad de evolución lo permite, instituyendo las medidas apropiadas para invertir el proceso.

Los niveles de NGAL se determinan preferiblemente mediante un método inmunoquímico. Los ejemplos de tales métodos incluyen, pero no están limitados en ningún modo a ELISA sándwich (enzimoinmunoanálisis de adsorción), un método de flujo lateral, o una tira reactiva.

## Descripción de las figuras

### Figura 1

Curva de eficacia diagnóstica (ROC) para los valores máximos de NGAL en orina con respecto al diagnóstico de afección renal en 60 pacientes adultos ingresados en la unidad de cuidados intensivos de un hospital. Sólo se incluyeron los pacientes que se pudieron clasificar a partir de otros datos como que tenían o no tenían afección renal.

### Figura 2

Curva de eficacia diagnóstica (ROC) para los valores máximos de NGAL en plasma con respecto al diagnóstico de afección renal en los mismos pacientes que en la figura 1.

### Figura 3

5 Curva de eficacia diagnóstica (ROC) para los valores máximos de NGAL en orina con respecto al diagnóstico de requerimiento de diálisis en 32 pacientes adultos ingresados en la unidad de cuidados intensivos de un hospital y diagnosticados clínicamente como que tienen afección renal.

### Figura 4

10 Evolución temporal de los valores de NGAL en orina y creatinina en plasma en un paciente anciano hombre operado de gravedad para la rotura de un aneurisma aórtico abdominal.

### Figura 5

15 Evolución temporal de los valores de NGAL en orina y creatinina en plasma en una paciente mujer que desarrolló septicemia que no afectó a la función renal. Se muestran el nivel de corte de NGAL en orina (329 ng/ml) para el diagnóstico de afección renal y el límite superior de normal para creatinina en plasma en mujeres (0,088 mmol/l).

### Descripción detallada de la invención

20 Se ha encontrado que las concentraciones de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) humana en muestras de orina humana sólo están moderadamente influidas por los estados infecciosos o inflamatorios. Sin embargo, los niveles de NGAL están marcadamente elevados en trastornos renales atribuidos a lesión isquémica y el aumento de NGAL es particularmente alto en NTA. Además, se ha encontrado ahora que los niveles en suero o plasma de NGAL no reflejan necesariamente estados infecciosos o inflamatorios, y pueden aumentar incluso cuando el recuento de neutrófilos en sangre es extremadamente bajo, como puede suceder en leucemias o como consecuencia del tratamiento de la leucemia. De hecho existe una estrecha correlación entre la concentración de NGAL en suero o plasma humano y la concentración de NGAL en orina cuando se analizan en muestras puntuales de sangre y orina de pacientes críticamente enfermos seleccionados al azar, mientras que hay correlaciones muy malas de estos niveles con el recuento de neutrófilos en sangre periférica o la concentración de proteína C reactiva, una proteína de fase aguda que se usa normalmente como marcador de inflamación. De esta manera, sin estar unidos por una teoría particular, se puede hipotetizar que los riñones producen NGAL en respuesta a isquemia y otras influencias capaces de estimular la expresión renal de NGAL, y no sólo se libera en grandes cantidades en la orina, sino también en la sangre, confundiendo de esta manera el uso de las determinaciones de NGAL en suero o plasma como un marcador de inflamación o de infección bacteriana como se explica en la patente de EE. UU. 6.136.526.

40 Según esto, la presente divulgación se refiere a la medida de NGAL en una muestra de fluido corporal, preferiblemente orina humana de la que se han eliminado los neutrófilos, como un marcador diagnóstico de trastornos renales, especialmente los debidos a isquemia renal o agentes nefrotóxicos. En la presente divulgación, para que la concentración de NGAL sea específicamente indicativa de trastorno renal, debe superar un valor de corte ajustado para excluir esas concentraciones más bajas de NGAL que pueden resultar de estados infecciosos o inflamatorios o carcinomas que no dan lugar a lesión renal.

50 El método comprende las etapas de medir la concentración de NGAL humana en una muestra de orina, preferiblemente centrifugada para eliminar los neutrófilos, del individuo que se va a diagnosticar, y comparar la concentración medida con un valor de corte seleccionado determinado para que supere esas concentraciones en orina encontradas en seres humanos que no tienen trastorno renal, pero que pueden estar aparentemente sanos o tener otros trastornos incluyendo afecciones inflamatorias, infecciones bacterianas o carcinomas. Si la concentración de NGAL medida supera el nivel de corte, esto es una indicación de que el ser humano ha sufrido lesión renal y puede desarrollar o ha desarrollado IRA, NTA o NTIA.

55 El nivel de corte por debajo del cual el nivel de NGAL en orina no puede ser diagnóstico de lesión renal con un grado aceptable de especificidad porque tal nivel se puede encontrar en individuos sanos o en los que padecen afecciones inflamatorias, infecciosas o cancerosas es preferiblemente un nivel de 250 ng/ml o más, tal como un valor entre 250 ng/ml y 525 ng/ml, tal como 275 ng/ml, o 300 ng/ml, o 325 ng/ml, o 350 ng/ml, o 375 ng/ml, o 400 ng/ml, o 425 ng/ml, o 450 ng/ml, o 475 ng/ml o 500 ng/ml. En otra forma de realización, el valor de corte usado es un valor de 1 µg/ml o un valor mayor. Preferiblemente, el valor predictivo positivo para el valor de corte en orina es el 80% o más, tal como el 85% o más, por ejemplo, el 90% o más. De forma alternativa, o además, el valor predictivo negativo para el valor de corte en orina es preferiblemente del 80% o más, tal como del 85% o más, por ejemplo del 90% o más.

65 En otra forma de realización, la presente invención comprende los pasos de medir la concentración de NGAL humana en una muestra de plasma o suero del individuo que se va a diagnosticar, y comparar la concentración medida con un valor de corte seleccionado determinado para que supere esas concentraciones de plasma o suero

encontradas en seres humanos que no tienen trastorno renal, pero que pueden estar aparentemente sanos o tener otros trastornos incluyendo afecciones inflamatorias, infecciones bacterianas o carcinomas. Si la concentración de NGAL medida supera el nivel de corte, esto es una indicación de que el ser humano ha sufrido lesión renal y puede desarrollar o ha desarrollado IRA, NTA o NTIA.

El nivel de corte para la concentración de NGAL en plasma o suero es similar a aquel para orina y es preferiblemente un nivel de 250 ng/ml o más, por ejemplo 300 ng/ml o un valor mayor, o un valor entre 250 ng/ml y 525 ng/ml, tal como 275 ng/ml, o 300 ng/ml, o 325 ng/ml, o 350 ng/ml, o 375 ng/ml, o 400 ng/ml, o 425 ng/ml, o 450 ng/ml, o 475 ng/ml o 500 ng/ml. Preferiblemente, el valor predictivo positivo para el valor de corte en plasma es el 80% o más, tal como el 85% o más, por ejemplo, el 90% o más. De forma alternativa, o además, el valor predictivo negativo para el valor de corte en plasma es preferiblemente del 80% o más, tal como del 85% o más, por ejemplo del 90% o más.

Un aspecto adicional es que el método se puede usar para distinguir lesiones renales graves que probablemente requieran alguna forma de diálisis, que típicamente dan lugar a niveles muy altos de NGAL en orina, de lesiones renales menos graves que pueden requerir sólo ocasionalmente diálisis, que típicamente dan lugar a aumentos menores de NGAL en orina.

De esta manera, un segundo nivel de corte, más alto, por debajo del cual el nivel en orina de NGAL no es predictivo de requerimiento de diálisis pero es diagnóstico para un grado menor de lesión renal, es preferiblemente un nivel entre 1000 ng/ml y 3000 ng/ml, tal como 1250 ng/ml, o 1500 ng/ml, o 1750 ng/ml, o 2000 ng/ml, o 2250 ng/ml, o 2500 ng/ml, o 2750 ng/ml. Preferiblemente, el valor predictivo positivo para el valor de corte mayor es del 80% o más, tal como del 85% o más, por ejemplo, del 90% o más. De forma alternativa, o además, el valor predictivo negativo para el valor de corte mayor es preferiblemente del 70% o más.

Un aspecto adicional es que el método se puede usar para detectar el inicio de la afección renal en un paciente que está en observación y/o tratamiento para otra enfermedad que puede o no ella misma estar asociada con un aumento de niveles de NGAL en líquidos corporales, y en el que la afección renal es una posible complicación. En esta situación las concentraciones de NGAL en orina o plasma o suero que se asocian con la afección subyacente del paciente se pueden seguir a diario o a intervalos más cortos, y el inicio de la afección renal estará indicado por un aumento en la concentración de NGAL en orina o plasma o suero sobre los niveles anteriores. En estas circunstancias, la magnitud del aumento en las concentraciones de NGAL indicativas del inicio de la afección renal es preferiblemente de 50 ng/ml o más, tal como 100 ng/ml o más, por ejemplo, 150 ng/ml o más, tal como 200 ng/ml o más, por ejemplo, 300 ng/ml o más, tal como 400 ng/ml o más, por ejemplo 500 ng/ml o más.

Un aspecto adicional es que el método se puede usar para seguir el curso de afecciones renales que dan lugar a niveles de NGAL aumentados, tanto en su evolución natural como en respuesta a medidas terapéuticas. En estas circunstancias, el cambio en los niveles de NGAL reflejará el estado de la lesión o regeneración renal, siempre que cualquier afección inflamatoria, infecciosa o cancerosa simultánea permanezca relativamente estable durante el periodo de seguimiento. Los intervalos a los que se toman muestras de los líquidos corporales para el seguimiento pueden ser cortos, proporcionando de esta manera la indicación más temprana posible de lesión renal y permitiendo así la institución temprana de medidas terapéuticas. El seguimiento de los niveles de NGAL en líquidos corporales para detectar afección renal preferiblemente se lleva a cabo a intervalos de no más de 24 horas, y más preferiblemente a intervalos más cortos hasta un periodo sugerido de no más de 3 horas, o incluso más corto por ejemplo si se sabe que se ha producido una lesión, por ejemplo durante un procedimiento quirúrgico.

La medida de NGAL humana en una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de orina, se puede realizar por cualquier método que proporcione especificidad, sensibilidad y precisión analíticas satisfactorias. Los métodos preferidos son ensayos de unión usando una o más moléculas de unión específicas para NGAL humana. Tales moléculas de unión incluyen, pero no están limitadas a, anticuerpos policlonales o monoclonales contra NGAL o moléculas específicas de unión a NGAL generadas por otros medios.

En un método preferido, se usan anticuerpos monoclonales generados contra NGAL recombinante humana. Se une un anticuerpo a un soporte sólido para capturar NGAL de una muestra, tal como una muestra de orina, mientras que el otro se une a un marcador tal como un complejo colorante o biotina o una enzima que se puede detectar mediante cualquiera de muchos métodos que conocen los expertos en la materia. El soporte sólido puede ser, por ejemplo una superficie de poliestireno o cloruro de polivinilo para enzimoanálisis de adsorción (ELISA), o partículas de látex (poliestireno), o un filtro sinterizado compuesto de partículas de polietileno comprimidas, o una matriz de nitrocelulosa porosa o de hecho cualquier soporte adecuado usado en análisis inmunoquímicos.

Un medio preferido para medir NGAL según la presente divulgación en una muestra de orina humana comprende una prueba de tira reactiva, de flujo lateral o de minicolumna, que permite el análisis rápido, cerca del paciente de una muestra. Como entenderán los expertos en la materia al leer esta divulgación, sin embargo, se pueden usar otros medios para medir NGAL.

En una forma de realización preferida, el método de la invención no comprende una etapa quirúrgica, terapéutica o diagnóstica practicada en el cuerpo humano o del animal.

Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan para ilustrar adicionalmente la presente invención.

5

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Prueba de tira reactiva para NGAL

10 Se recubre el área analítica de una tira reactiva compuesta de una superficie de poliestireno con un anticuerpo de captura contra NGAL humana. Se añade una alícuota de la muestra centrifugada y diluida a una solución de anticuerpo de detección marcado con enzima contra NGAL en el primer tubo, en el que se sumerge la tira reactiva. Los complejos de anticuerpo de detección marcado con enzima con NGAL se unen a la tira reactiva, que se lava luego con agua del grifo y se coloca en una solución de sustrato cromogénico en un segundo tubo. El color desarrollado en la solución de sustrato en un tiempo determinado se lee o bien a ojo y se compara con una escala de intensidades de colores que indica la concentración de NGAL en la muestra de orina, o en un colorímetro sencillo que se puede, por ejemplo, programar para que indique la concentración de NGAL directamente.

15

### Ejemplo 2: Dispositivo de flujo lateral para NGAL

20

Se recubre un dispositivo de flujo lateral compuesto de una tira de nitrocelulosa porosa cerca de su extremo distal con un anticuerpo de captura contra NGAL aplicado como una banda transversal. Se coloca una banda transversal adicional de anticuerpo contra los anticuerpos de la especie de la que deriva el anticuerpo de detección de forma distal a la banda de anticuerpo de captura y sirve como un control de la función de la tira. El extremo proximal de la tira contiene el anticuerpo de detección contra NGAL adsorbido o unido a partículas de poliestireno marcadas o partículas de complejo colorante. Cuando se aplica una alícuota de la muestra de orina centrifugada al extremo proximal de la tira, las partículas marcadas unidas al anticuerpo de detección viajan a lo largo de la tira por atracción capilar. Cuando alcanzan la banda de anticuerpo de captura, sólo se retendrán aquellas partículas que hayan unido NGAL, dando lugar a una banda detectable. Las partículas que alcanzan la banda control de anticuerpo contra el anticuerpo de detección producirán una banda detectable hayan unido NGAL o no. La intensidad de las bandas marcadas se puede leer a ojo en el caso de partículas coloreadas o por medio del dispositivo de detección apropiado para el marcador usado. Un resultado positivo está indicado por el desarrollo de color o la acumulación de marcador en ambas bandas, mientras que un resultado negativo está indicado por el desarrollo de color u otro marcador sólo en la banda control. La falta del desarrollo de color u otro marcador en la banda control indica una función inadecuada de la tira. La sensibilidad de la prueba se puede regular mediante la dilución de la muestra aplicada, que se ajusta de modo que sólo las concentraciones de NGAL por encima de los valores de corte determinados den lugar a un resultado positivo. La sensibilidad de la prueba también se puede ajustar uniendo el anticuerpo de detección a una mezcla de partículas marcadas y sin marcar. Se pueden precalibrar lotes de tiras y equipar con un código de calibración que pueda leer el dispositivo de detección, de modo que se pueda leer del dispositivo un resultado cuantitativo o semicuantitativo. Son posibles muchas variaciones de los aspectos individuales de esta tecnología de flujo lateral, como saben los expertos en la materia.

25

30

35

40

### Ejemplo 3: Prueba en minicolumna de NGAL

45 Una minicolumna contiene una frita hecha de partículas de polietileno comprimidas que permiten el paso de líquido y células. La frita se recubre con anticuerpo de captura contra NGAL humana. La minicolumna se incorpora en un dispositivo, que por medio de manejo automatizado de líquido permite que se aplique la muestra diluida a una velocidad de flujo y volumen fijados, seguido por detección del anticuerpo en complejo con colorante. Después de pasar solución de lavado, se lee la intensidad de color de la frita por fotometría de difusión de luz. Los lotes de fritas se precalibran y las minicolumnas se equipan con un código de calibración que puede leer el dispositivo, de modo que el instrumento puede mostrar un resultado cuantitativo sin necesidad de calibración anterior con patrones.

50

### Ejemplo 4: ELISA sándwich de NGAL

55 Se preparó NGAL recombinante humana purificada para su uso como estándar y como material calibrador como describen Kjeldsen *et al.*, (1996). Los anticuerpos contra NGAL fueron los descritos por Kjeldsen *et al.*, (1993; 1996). Se recubrieron placas de poliestireno de ELISA durante la noche a 4°C con anticuerpo 211-1 a una concentración de 2 µg/ml en tampón carbonato de sodio 0,05 M, pH 9,4, aplicado a 100 µl/pocillo. Los pocillos se vaciaron, se lavaron 3 veces con tampón de lavado de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, que contenía Tween 20 al 0,05%, y se transfirieron. Se aplicaron a los pocillos diluciones del calibrador y muestras en tampón de dilución (tampón de lavado que contenía albúmina bovina a 0,1 mg/ml) en volúmenes de 100 µl y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en una mesa con agitación. Los pocillos se vaciaron después, se lavaron y se transfirieron como antes. Se añadió anticuerpo 211-2 biotinilado a 0,25 µg/ml en tampón de dilución a cada pocillo a 100 µl/pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en una mesa con agitación. Los pocillos se vaciaron después, se lavaron y se transfirieron como antes. Se añadió un complejo de peroxidasa de rábano y estreptavidina (Zymed, CA) a una dilución de 1/2000 en tampón de dilución a cada pocillo a 100 µl/pocillo y se incubó durante 1

60

65

- hora a temperatura ambiente en una mesa con agitación. Los pocillos se vaciaron después, se lavaron y se transfirieron como antes. Se aplicó luego una solución sustrato que contenía tetrametilbencidina y peróxido (TMB-ONE, Kem-En-Tech, Dinamarca) a cada pocillo a 100 µl/pocillo y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante exactamente 8 minutos, después de lo cual se paró la reacción de color añadiendo 50 µl de ácido sulfúrico 1 M a cada pocillo. Se midieron después las absorbancias de luz de los pocillos a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas de ELISA, restando las absorbancias de luz a 650 nm. Se calcularon después las concentraciones de NGAL en las muestras a partir de la curva patrón generada de las lecturas de la absorbancia de luz de los calibradores de concentración conocida.
- El ensayo tenía un intervalo de 0,02 ng/ml a 1 ng/ml, con un límite de detección (límite de confianza de diferencia de cero del 95%) de 2,4 pg/ml, y mostró paralelismo entre diluciones de calibrador purificado y muestras. La concentración de NGAL fue de 90 ng/ml en una mezcla de suero humano normal y de 5,4 ng/ml en una mezcla de orina humana normal.
- Los ejemplos adicionales muestran las correlaciones clínicas y paraclínicas, junto con una estimación del valor diagnóstico con respecto a trastorno renales, de la determinación de NGAL en suero o plasma y en orina de pacientes adultos sin seleccionar ingresados en la unidad de cuidados intensivos de un hospital. Se determinó NGAL mediante un ELISA sándwich similar en todos los detalles esenciales al descrito en el ejemplo 4 anteriormente.

#### Ejemplo 5: Correlaciones clínicas y paraclínicas iniciales

- Se muestran las concentraciones de NGAL en muestras puntuales únicas de orina y suero de 11 pacientes adultos no seleccionados ingresados en la unidad de cuidados intensivos de un hospital en la tabla 1, donde se comparan con datos clínicos y paraclínicos.

**Tabla 1. Concentraciones de NGAL en orina y suero de 11 pacientes: correlaciones con datos clínicos y paraclínicos.**

Pt. no.	Diagnóstico	NGAL-o orden ng/ml	NGAL-s orden ng/ml	creatinina -p orden µM	Neutróf. orden x 10 <sup>9</sup> /ml	CRP-s orden µg/ml
1	MT, oliguria	10	10	10	11	2
		8640	435	366	15,6	31
2	Rupt. an. aórtico, anuria, hemodiálisis	7	9	11	7	6
		1490	342	605	9,6	71
3	LLA de células B, neumonía	9	8	2	2	10
		3800	330	63	2,0	97
4	Peritonitis fecal	8	7	7	9	9
		2700	273	108	16	87
5	Septicemia por <i>S. aureus</i> , NTA	11	11	6	8	8
		15.700	922	103	13,9	81
6	LMA, choque séptico	6	5	9	1	4
		1030	146	164	<0,1	56
7	SHR bacteriemia por <i>E. faecalis</i>	3	3	3	5	1
		900	92	82	6,7	19
8	Hematoma, SDRA	5	4	8	6	3
		1000	114	154	9,5	37
9	TM	1	1	4	4	11
		110	66	91	5,7	103
10	TM	4	6	5	3	7
		950	147	98	5,0	81
11	esplenectomía, diafragma perforado	2	2	1	10	5
		130	79	30	19	62

Valores normales: NGAL-s 90 ng/ml, NGAL-o 5,4 ng/ml

LLA: leucemia linfática aguda; LMA: leucemia mieloide aguda; SDRA: síndrome de dificultad respiratoria del adulto; NTA: necrosis tubular aguda; CRP: proteína C reactiva; SHR: síndrome hepato-renal; TM: traumatismo múltiple; p: plasma; s: suero; o: orina;

5

**Coefficientes de Spearman de correlación de orden (r)**

NGAL-o/NGAL-s: r 0,945 P<<0,001

10

NGAL-o/creatinina-p: r 0,418 P 0,1

NGAL-s/recuento de neutrófilos; r 0,273, no significativo

15

NGAL-s/CRP-s: r 0,064, no significativo

20

Todos los pacientes tenían concentraciones elevadas en orina de NGAL. Había una correlación muy estrecha entre los niveles de NGAL en suero y en orina, pero sólo una correlación moderada entre NGAL en orina y creatinina en plasma. El caso que se diagnosticó clínicamente como NTA se caracterizó por NGAL en orina extraordinariamente alta a un tiempo donde no hubo aumento significativo de creatinina en plasma. La mala correlación entre NGAL en suero y el recuento de neutrófilos muestra que NGAL en suero no es un reflejo de la neutrofilia. En particular, NGAL tanto en orina como en suero aumentaron en el paciente no. 3, con un recuento de neutrófilos de sólo  $2,0 \times 10^9/ml$  debido a la leucemia linfática aguda, y en el paciente no. 6, con un número de neutrófilos incontablemente bajo debido a la leucemia mieloide aguda. Además, la falta de correlación con CRP muestra que NGAL-s no es sólo una proteína de fase aguda. Los análisis repetidos de muestras almacenadas mostraron que NGAL puede tener una estabilidad limitada en muestras de orina, mientras que es más estable en muestras de suero. Los resultados sugieren que NGAL se produce en daño de órganos, particularmente, pero no sólo, por los riñones. Se vierte a la sangre y se excreta en la orina. Sin embargo, la NGAL renal en NTA también pasa directamente a la orina para producir una concentración de NGAL en orina muy alta.

30

Los pacientes nos. 3 y 4, que en el momento del muestreo no tenían diagnóstico clínico de trastorno renal y cuya creatinina-p estaba a ese momento en el intervalo normal, tenían niveles de NGAL en orina que eran mayores que los del paciente no. 2, que estaba recibiendo hemodiálisis para la anuria después de la ruptura de un aneurisma aórtico. Los dos pacientes (nos. 3 y 4) podían haber desarrollado lesión isquémica renal debido a sus infecciones graves, precediendo el aumento en NGAL en orina a cualquier aumento en creatinina-p, como también se observó en el paciente no. 5, que se diagnosticó clínicamente como que tenía NTA.

35

**Ejemplo 6: Poder diagnóstico con respecto a trastornos renales de las determinaciones de NGAL en orina y plasma en pacientes adultos no seleccionados ingresados en cuidados intensivos**

40

Se determinó NGAL en muestras de orina y plasma recogidas cada mañana de 109 pacientes consecutivos ingresados en la unidad de cuidados intensivos de un hospital. En base a los informes de alta y los resultados de análisis de sangre rutinarios, fue posible clasificar (sin conocimiento previo respecto a los datos de NGAL) 60 de estos pacientes en aquellos con y sin una afección renal durante su ingreso. Los datos incompletos hicieron imposible clasificar los 49 pacientes restantes con suficiente seguridad, y estos pacientes se excluyeron del análisis.

45

Las concentraciones máximas de NGAL en orina y plasma de los 60 pacientes clínicamente clasificables se dan en la tabla 2. El poder diagnóstico con respecto a afección renal de la concentración máxima de NGAL alcanzada en orina y plasma de cada paciente clasificado de determinó después representando curvas de eficacia diagnóstica (ROC) para los valores en orina y plasma. También se representaron los valores de NGAL en orina y plasma de las evoluciones diarias para cada paciente y se compararon con datos paraclínicos tales como los valores de creatinina en plasma.

50

**Tabla 2. Concentraciones máximas de NGAL en plasma y orina de 60 pacientes ingresados en cuidados intensivos que fueron clínicamente clasificables como con o sin afección renal.**

Paciente número	NGAL en plasma ng/ml	NGAL en orina ng/ml	Clasificación clínica			
			Afección renal	Septicemia	Cáncer	Hemodiálisis
1	92	50	-	-	-	-
2	1005	5000	+	-	-	+
3	151	183	-	+	-	-
6	1320	5000	+	+	-	+
7	777	3229	+	+	+	+
8	712	269	+	+	+	-
9	2941	5000	+	-	-	+
10	3092	5000	+	-	-	+

Paciente número	NGAL en plasma ng/ml	NGAL en orina ng/ml	Clasificación clínica			
			Afección renal	Septicemia	Cáncer	Hemodiálisis
11	65	13	-	-	-	-
12	2117	5000	+	+	-	+
15	546	3128	+	+	+	-
17	110	10	+	-	-	-
18	135	68	-	-	-	-
19	191	2672	+	+	+	+
20	336	304	-	-	+	-
21	1434	5000	+	+	-	+
24	307	1042	+	-	-	+
29	71	50	-	-	-	-
30	320	874	-	-	-	-
39	1416	1073	+	+	-	-
41	181	42	-	-	-	-
42	115	29	-	-	-	-
43	436	176	+	-	-	-
44	446	680	+	-	-	-
45	270	37	-	-	-	-
46	1962	3222	+	+	+	+
47	222	89	-	+	-	-
48	1040	3974	+	-	-	+
49	228	48	-	-	-	-
51	256	519	+	-	+	+
52	294	685	+	+	+	-
53	586	1337	+	+	+	-
54	1376	2915	+	-	+	+
55	1276	5000	+	+	+	+
57	180	24	-	-	-	-
58	716	3431	+	-	-	+
59	108	9	-	+	-	-
60	1219	2713	+	+	+	+
65	460	1705	-	-	+	-
67	1470	5000	+	-	-	+
69	318	68	-	+	-	-
72	175	17	-	-	-	-
75	645	3360	+	-	+	+
80	322	328	-	+	+	-
82	216	30	-	+	-	-
83	259	34	-	+	-	-
84	25	20	-	-	-	-
85	1067	370	+	+	-	+
86	64	21	-	-	-	-
87	276	779	+	-	-	-
88	302	1024	-	+	-	-
91	236	17	-	-	-	-
93	1595	5000	+	+	-	+
97	3491	708	+	+	+	+
99	820	401	+	+	-	+
100	354	85	-	-	+	-
101	1144	5000	+	+	+	+
104	1844	2748	+	+	-	+
105	488	4473	+	-	-	+
108	111	46	-	+	-	-

La figura 1 muestra la curva ROC para los valores máximos de NGAL en orina con respecto al diagnóstico de afección renal. El área bajo la curva fue de 0,930 y se determinó que el valor de corte por debajo del cual la concentración de NGAL en orina no es diagnóstica de trastorno renal estaba entre 370 ng/ml y 329 ng/ml. Con un valor de corte en este intervalo la sensibilidad del diagnóstico fue del 96,9%, la especificidad del diagnóstico fue del 89,3%, el valor predictivo positivo fue del 91,2% y el valor predictivo negativo fue del 96,2%.

5

La figura 2 muestra la curva ROC para los valores máximos de NGAL en plasma con respecto al diagnóstico de afección renal. El área bajo la curva fue de 0,914 y se determinó que el valor de corte por debajo del cual la concentración de NGAL en plasma no es diagnóstica de trastorno renal estaba entre 436 ng/ml y 355 ng/ml. Con un valor de corte en este intervalo la sensibilidad del diagnóstico fue del 84,8%, la especificidad del diagnóstico fue del 96,3%, el valor predictivo positivo fue del 93,1% y el valor predictivo negativo fue del 83,9%.

### Diagnóstico del requerimiento de diálisis

Los pacientes con afección renal se dividieron en dos grupos con respecto a los valores máximos de NGAL en orina observados. El primer grupo (11 pacientes) se caracterizaba por valores de NGAL en orina de 1337 ng/ml o menos, y contenía pacientes con grados menores de afección renal juzgados por otros datos clínicos y paraclínicos. En este grupo 3 pacientes recibieron alguna forma de hemodiálisis. El segundo grupo (21 pacientes) estaba caracterizado por valores de NGAL en orina de 2672 ng/ml o más y contenía 17 pacientes diagnosticados clínicamente como que tenían NTA o NTIA. En este grupo 20 pacientes requirieron alguna forma de hemodiálisis. El valor de corte por debajo del cual la concentración de NGAL en orina no es predictiva de necesidad de diálisis pero puede ser diagnóstica de un grado menor de trastorno renal está por lo tanto entre 1338 y 2672 ng/ml.

La figura 3 muestra la curva ROC para los valores máximos de NGAL en orina con respecto al diagnóstico de afección renal que requiere diálisis. El área bajo la curva fue de 0,807 y se confirmó que el valor de corte por debajo del cual la concentración de NGAL en orina no es diagnóstica de requerimiento de diálisis estaba entre 1338 ng/ml y 2672 ng/ml. Con un valor de corte en este intervalo la sensibilidad del diagnóstico fue del 87,0%, la especificidad del diagnóstico fue del 88,9%, el valor predictivo positivo fue del 95,2% y el valor predictivo negativo fue del 72,7%.

### Evolución temporal de valores de NGAL

Cuando se representó la evolución temporal de los valores diarios de NGAL en orina y plasma y se comparó con los datos clínicos y paraclínicos en pacientes individuales clasificados, se observó que aumentos de 86 ng/ml, 125 ng/ml y 200 ng/ml en NGAL en orina sobre el nivel anterior estaban asociados con un deterioro de la función renal como se registra en el informe de alta o se muestra por un aumento en el nivel de creatinina en plasma. Aumentos de NGAL en orina de más de 200 ng/ml sobre el nivel anterior también se asociaron con debilitamiento de la función renal cuando estos aumentos llevan el nivel de NGAL en orina por encima del nivel de corte de 329 ng/ml. El número de pacientes que claramente mostraba este tipo de aumento intercurrente en NGAL en orina no fue lo suficientemente grande para permitir un análisis significativo del valor diagnóstico con respecto a la insuficiencia renal aguda en relación a la magnitud del aumento.

En algunos casos hubo un paralelismo entre el aumento en NGAL en orina y el aumento en la creatinina en plasma atribuido al debilitamiento de la función renal. La figura 4 muestra tal aumento paralelo en NGAL en orina y creatinina en plasma en un paciente varón anciano operado de gravedad por la ruptura de un aneurisma aórtico abdominal. Aquí la lesión isquémica a los riñones debido a la hemorragia y el pinzamiento aórtico tuvo lugar el día anterior a las primeras muestras de plasma y orina, de modo que los niveles iniciales de NGAL en orina y creatinina en plasma eran ambos indicativos de un grado de insuficiencia renal.

Un aumento en la NGAL en orina de 200 ng/ml o más sobre el valor anterior, pero hasta un valor que permanece por debajo del nivel de corte de 329 ng/ml, no es diagnóstico de insuficiencia renal aguda, ya que puede ser debido a otra afección, tal como septicemia, que no afecta necesariamente a los riñones. La figura 5 muestra tal aumento en NGAL en orina que se asoció con el desarrollo de una septicemia que no afectó a la función renal, apoyado por el hecho de que el nivel de creatinina en plasma se mantuvo bien dentro intervalo normal a lo largo del curso clínico en la unidad de cuidados intensivos.

### Referencias

Aulitzky WK, Schlegel PN, Wu DF, Cheng CY, Chen CL, Li PS, Goldstein M, Reidenberg M, Bardin CW (1992) Measurement of urinary clusterin as an index of nephrotoxicity. *Proc Soc Exp Biol Med* 199:93-96.

Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV (2002) Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 62:237-244.

Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N (1993) Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 268:10425-10432.

Kjeldsen L, Koch C, Arnljots K, Borregaard N (1996) Characterization of two ELISAs for NGAL, a newly described lipocalin in human neutrophils. *J Immunol Methods* 198:155-164.

Kotanko P, Margreiter R, Pfaller W (2000) Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and neopterin aid in the diagnosis of rejection and acute tubular necrosis in initially nonfunctioning kidney grafts. *Nephron* 84:228-235.

- Liu Q, Nilsen-Hamilton M (1995) Identification of a new acute phase protein. *J Biol Chem* 270:22565-22570.
- Monier F, Surla A, Guillot M, Morel F (2000) Gelatinase isoforms in urine from bladder cancer patients. *Clin Chim Acta* 299:11-23.
- 5 Muramatsu Y, Tsujie M, Kohda Y, Pham B, Perantoni AO, Zhao H, Jo SK, Yuen PS, Craig L, Hu X, Star RA (2002) Early detection of cysteine rich protein 61 (CYR61, CCN1) in urine following renal ischemic reperfusion injury. *Kidney Int* 62:1601-1610.
- 10 Penders J, Delanghe JR (2004) Alpha 1-microglobulin: clinical laboratory aspects and applications. *Clin Chim Acta* 346:107-118.
- Stoesz SP, Gould MN (1995) Overexpression of neu-related lipocalin (NRL) in neu-initiated but not ras or chemically initiated rat mammary carcinomas. *Oncogene* 11:2233-2241.
- 15 Triebel S, Blaser J, Reinke H, Tschesche H (1992) A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett* 314:386-388.
- 20 Tsuchida T, Eguchi N, Eguchi Y, Numabe A, Nakajima H, Oda H, Seiki K, Hakamada-Taguchi R, Urade Y, Uehara Y (2004) Lipocalin-type prostaglandin D synthase in urine in adriamycin-induced nephropathy of mice. *Nephron Physiol* 96:42-51.
- 25 Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA (2001) The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem* 276:37258-37265.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de distinción entre una afección que no afecta al riñón, en donde la afección que no afecta al riñón es un trastorno inflamatorio, un trastorno infeccioso o un trastorno canceroso, y la probabilidad de un trastorno renal, en donde el trastorno renal se selecciona de insuficiencia renal aguda, necrosis tubular aguda y nefropatía tubulointerstitial aguda, en un ser humano, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 10 i) determinar la concentración de lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) humana en una muestra de fluido corporal del ser humano,
- ii) comparar dicha concentración con un valor de corte predeterminado, dicho valor de corte se elige para excluir las concentraciones menores de NGAL asociadas con afecciones que no afectan al riñón, en donde una concentración por encima del valor de corte es indicativa de la probabilidad del trastorno renal.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en donde el fluido corporal es orina, plasma o suero.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende la etapa adicional de repetir las etapas i) y ii) una o más veces.
- 20 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende la etapa adicional de repetir las etapas i) y ii) dentro de 24 horas, por ejemplo, dentro de 12 horas, tal como dentro de 6 horas, por ejemplo, dentro de 3 horas.
- 25 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende la etapa adicional de repetir las etapas i) y ii) después de que se ha iniciado o completado un tratamiento del trastorno renal.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el trastorno renal es una lesión renal post-isquémica.
- 30 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el trastorno renal está producido por un agente nefrotóxico.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde NGAL se mide por medio de una molécula que se une específicamente a NGAL.
- 35

Fig. 1

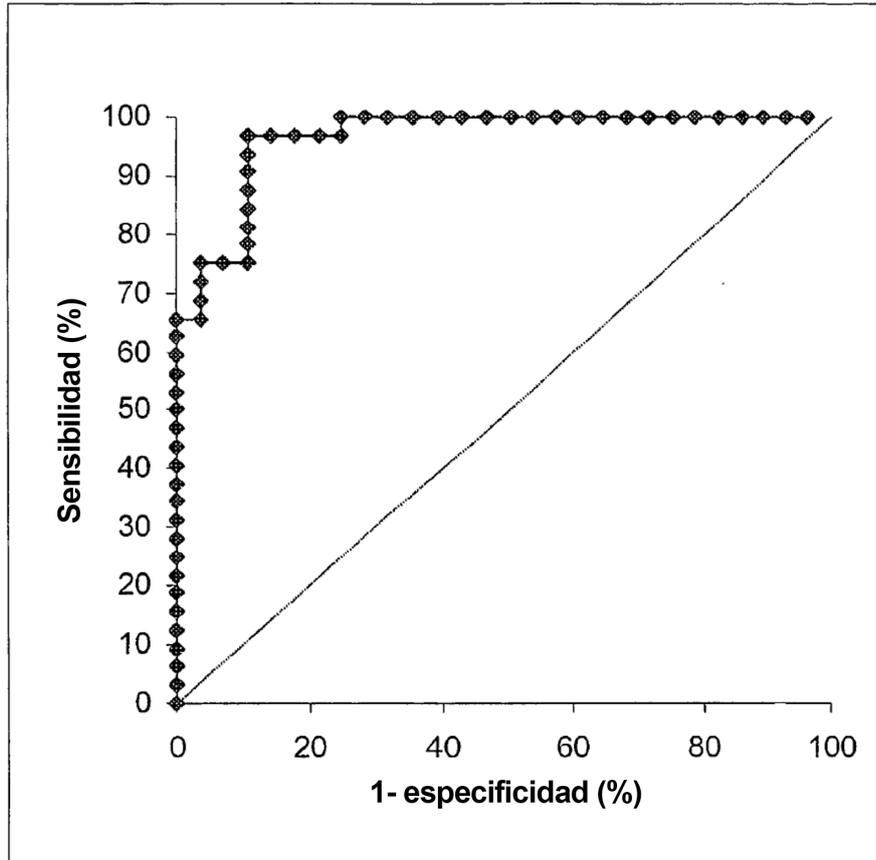


Fig. 2

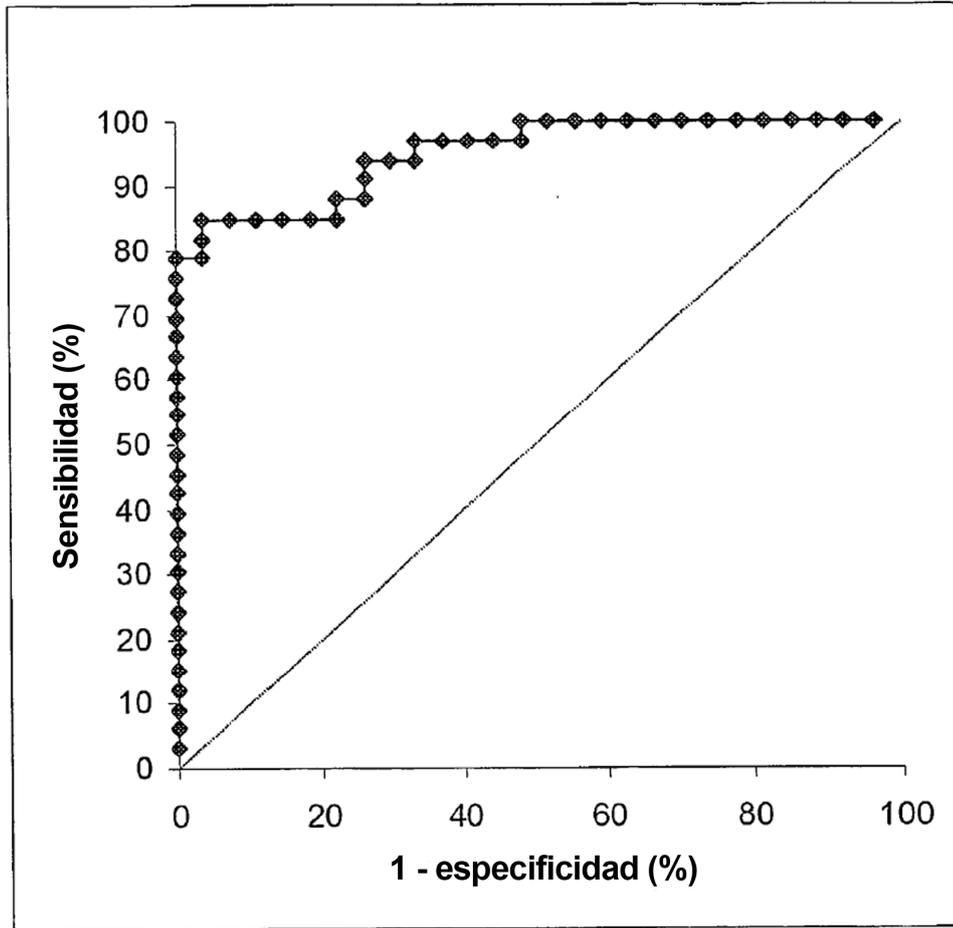


Fig. 3

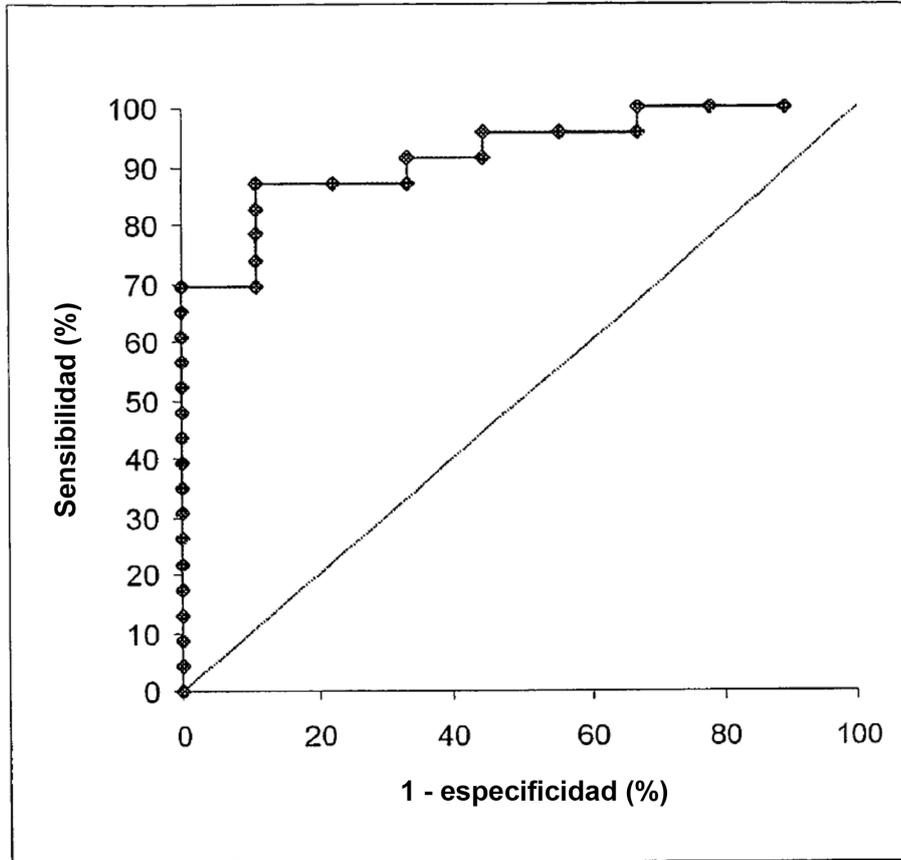


Fig. 4

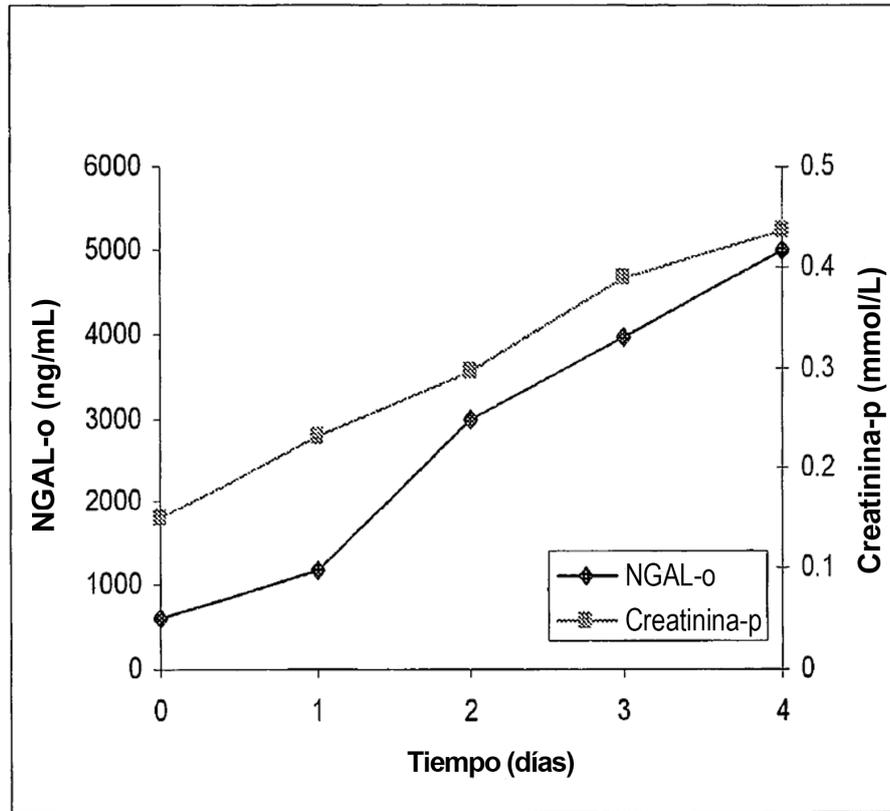


Fig. 5

