

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 235**

21 Número de solicitud: 202330600

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/493 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

14.07.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.01.2025

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS (90.00%)
Calle Tulipán s/n
28933 Móstoles (Madrid) ES;
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA (5.00%) y
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL 12 DE OCTUBRE
(5.00%)

72 Inventor/es:

GARCÍA CARRASCO, Almudena;
MEDINA GÓMEZ, Gema;
IZQUIERDO LAHUERTA, Adriana;
PORRINI, Esteban y
MORALES, Enrique

74 Agente/Representante:

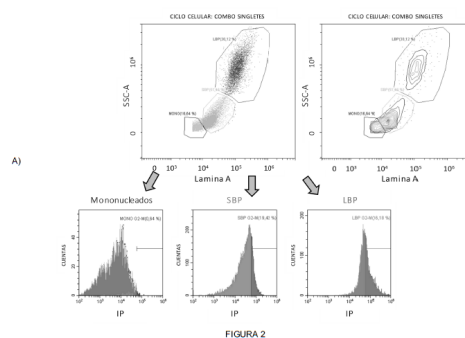
PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MÉTODOS PARA PREDECIR EL RIESGO DE DAÑO RENAL MEDIANTE LA DETECCIÓN DE
PODOCITOS BINUCLEADOS EN ORINA**

57 Resumen:

Métodos para predecir el riesgo de daño renal mediante la detección de podocitos binucleados en orina.

La presente invención se refiere a un método in vitro para predecir el riesgo de daño renal en un individuo, donde el método comprende determinar la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en una muestra de orina obtenida de dicho individuo, donde un incremento de la ratio de podocitos binucleados frente a células totales con respecto a un valor de referencia es indicativo de un riesgo aumentado de que el paciente sufra daño renal. La invención se refiere además a un método para seleccionar a un individuo para recibir tratamiento preventivo para el daño renal, a un kit para el diagnóstico precoz de daño renal en un individuo, y a usos relacionados.



DESCRIPCIÓN

**MÉTODOS PARA PREDECIR EL RIESGO DE DAÑO RENAL MEDIANTE LA
DETECCIÓN DE PODOCITOS BINUCLEADOS EN ORINA****CAMPO DE LA INVENCIÓN**

5

La presente invención pertenece al campo del diagnóstico temprano de enfermedades. En particular, la invención divulga un método *in vitro* para el diagnóstico precoz de daño renal, antes de que existan manifestaciones clínicas de enfermedad en el paciente.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

La obesidad es una enfermedad caracterizada por la acumulación excesiva de tejido adiposo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define científicamente la obesidad como un Índice de Masa Corporal (IMC) igual o superior a 30 kg/m². Casi uno de cada
15 cinco ciudadanos europeos sufre de obesidad y la prevalencia de la obesidad sobre la población general en Europa y en España ha ido creciendo significativamente en las últimas décadas. La obesidad está ligada a varias patologías, siendo el daño renal una de estas dolencias. Durante el daño renal asociado con la obesidad se produce vasodilatación glomerular, de tal manera que los podocitos que forman el revestimiento epitelial de la
20 cápsula de Bowman a través del cual se produce la filtración de la sangre se desprenden y se vierten en la orina. La pérdida podocitaria altera la función renal, el glomérulo deja de filtrar correctamente la sangre, y aparecen cantidades anormales de proteína en la orina. Actualmente, la enfermedad renal se detecta cuando ya es demasiado tarde, ya que el diagnóstico se realiza de manera rutinaria mediante la presencia de proteínas en orina
25 (proteinuria o albuminuria). Por este motivo, es esencial contar con marcadores tempranos de daño renal.

Diversos estudios parecen sugerir que se puede diagnosticar el daño renal temprano mediante la detección de la pérdida de podocitos, ya que este proceso precede a la pérdida
30 de proteínas. Así, se han realizado varios intentos para detectar daño glomerular temprano a través de análisis de muestras de orina, usando proteínas podocitarias no específicas. Por ejemplo, estudios previos han utilizado células positivas para podocalicina en sedimentos urinarios de pacientes y de individuos sanos para cuantificar la podocituria. Estas detecciones se basan en técnicas de microscopía, y se realizan sobre muestras de
35 orina puntuales, donde el resultado se extrapola a muestras de orina en 24 horas. Sin embargo, la podocalicina no es un marcador exclusivo para este tipo de células. En otros

estudios se han utilizado otros marcadores en orina para detectar daño renal tales como los niveles de proteína y ARNm de podocina y nefrina, pero su utilidad clínica no ha sido probada. En cualquier caso, estos estudios previos demuestran que se pueden detectar, en la orina de pacientes con obesidad mórbida, marcadores de ciertas proteínas asociadas a los podocitos que son indicativos de daño renal, incluso cuando el paciente presenta tasas normales de albuminuria. En la detección de los marcadores de podocitos en muestras de orina hay que tener en cuenta que sus concentraciones suelen ser muy bajas y que los resultados pueden verse enmascarados por efectos variables de la concentración en la orina.

En vista de lo anterior, existe una necesidad en este campo técnico de contar con marcadores tempranos de daño renal que no se vean afectados por los problemas de detección dependientes de la concentración de dichos marcadores en las muestras de orina y que además tengan relevancia clínica.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención enseña un protocolo no invasivo para la detección de la presencia de podocitos en la orina de pacientes con obesidad, donde el método se basa en la detección de los marcadores nefrina y lamina A, y en la determinación de la ratio entre el número de podocitos y el número total de células encontradas en las muestras de orina.

Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir el riesgo de daño renal en un individuo, donde el método comprende determinar la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en una muestra de orina obtenida de dicho individuo, donde un incremento de la ratio de podocitos binucleados frente a células totales con respecto a un valor de referencia es indicativo de un riesgo aumentado de que el paciente sufra daño renal.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para seleccionar a un individuo para recibir tratamiento para prevenir el daño renal, donde el método comprende determinar la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en una muestra de orina obtenida de dicho individuo, donde un incremento de la ratio de podocitos binucleados frente a células totales con respecto a un valor de referencia es indicativo de que el paciente es seleccionado para recibir tratamiento preventivo para el daño renal.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit para el diagnóstico de daño renal en un individuo, donde el kit comprende reactivos adecuados para detectar la presencia de células caracterizadas por ser positivas para el biomarcador nefrina y el biomarcador lamina A en una muestra de orina de dicho individuo, donde dichos reactivos comprenden al menos el 10% de los reactivos presentes en el kit.

En un último aspecto, la invención se refiere a un uso de la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en una muestra de orina obtenida de un individuo como marcador de daño renal.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Estrategia de *gating* para la detección de diferentes poblaciones de podocitos en la orina de pacientes con obesidad: A) muestra de orina marcada; B) eventos doblemente marcados teñidos con y anticuerpo anti-nefrina (conjugado con Alexa 647) y anti-lamina A (conjugado con FITC) detectados entre todos los eventos presentes en la muestra de orina; C) tres poblaciones diferentes detectadas a través del eje FSC-A; D) las mismas tres poblaciones diferentes mejor observadas a través del eje SSC-A, las poblaciones se clasifican como Lamina +, Lamina ++ o Lamina +++ en función de sus diferentes niveles de contenido en lamina A; E) singletes seleccionados; F) combinación de singletes en un mismo gráfico para la identificación y cuantificación de podocitos mononucleados (MONO), podocitos binucleados pequeños (SBP) y podocitos binucleados grandes (LBP).

Figura 2. Podocitos con un mayor contenido en lamina A también exhiben un mayor contenido de ADN sin relación con apoptosis. A) Determinación del ciclo celular mediante yoduro de propidio en las poblaciones marcadas como nefrina + con diferentes niveles de lamina A. B) Determinación del contenido de anexina V en poblaciones marcadas como nefrina + con diferentes niveles de lamina A. MONO: podocitos mononucleados. SBP: podocitos binucleados pequeños. LBP: podocitos binucleados grandes.

Figura 3. Análisis del número de podocitos en orina 24 horas. Determinación del número y del porcentaje de cambio en A) volumen de orina en 24 horas, B) número de podocitos totales, C) número de podocitos mononucleados, D) número de podocitos binucleados, E) número de podocitos binucleados pequeños, y F) número de podocitos binucleados grandes, mediante citometría de flujo usando como marcadores anti-nefrina y anti-lamina. SBP: podocitos binucleados pequeños. LBP: podocitos binucleados grandes. Las barras

grises indican la media para cada grupo. Cada paciente y cada individuo control se representa de manera individual. ● para DELGADOS; ■ para OBS y ▲ para OAS. Se realizó una prueba t no pareada para comparar OBS frente a DELGADOS (* valor de $p \leq 0,05$; ** valor de $p \leq 0,01$). Se utilizó ANOVA de medidas repetidas para comparar OAS vs OBS (ns: no significativo, \$ valor de $p \leq 0,01$; \$\$ valor de $p \leq 0,01$; \$\$\$ valor de $p \leq 0,001$).

Figura 4. Análisis de la concentración de diferentes poblaciones de podocitos. Determinación de la concentración y del porcentaje de cambio en a) concentración de podocitos totales, b) concentración de podocitos mononucleados, c) concentración de podocitos binucleados, d) concentración de podocitos binucleados pequeños, y e) concentración de podocitos binucleados grandes, mediante citometría de flujo usando como marcadores anti-nefrina y anti-lamina. SBP: podocitos binucleados pequeños. LBP: podocitos binucleados grandes. Las barras grises indican la media para cada grupo. Cada paciente y cada individuo control se representa de manera individual. ● para DELGADOS; ■ para OBS y ▲ para OAS. Se realizó una prueba t no pareada para comparar OBS frente a DELGADOS (* valor de $p \leq 0,05$; ** valor de $p \leq 0,01$). Se utilizó ANOVA de medidas repetidas para comparar OAS vs OBS (ns: no significativo, \$ valor de $p \leq 0,01$; \$\$ valor de $p \leq 0,01$; \$\$\$ valor de $p \leq 0,001$).

Figura 5. Análisis del número de podocitos en función de los mg de creatinina. Determinación del número y del porcentaje de cambio en A) mg de creatinina en orina en 24 horas, B) número de podocitos totales por mg de creatinina, C) número de podocitos mononucleados por mg de creatinina, D) número de podocitos binucleados por mg de creatinina, E) número de podocitos binucleados pequeños por mg de creatinina, y F) número de podocitos binucleados grandes por mg de creatinina, mediante citometría de flujo usando como marcadores anti-nefrina y anti-lamina. SBP: podocitos binucleados pequeños. LBP: podocitos binucleados grandes. Las barras grises indican la media para cada grupo. Cada paciente y cada individuo control se representa de manera individual. ● para DELGADOS; ■ para OBS y ▲ para OAS. Se realizó una prueba t no pareada para comparar OBS frente a DELGADOS (* valor de $p \leq 0,05$; ** valor de $p \leq 0,01$). Se utilizó ANOVA de medidas repetidas para comparar OAS vs OBS (ns: no significativo, \$ valor de $p \leq 0,01$; \$\$ valor de $p \leq 0,01$; \$\$\$ valor de $p \leq 0,001$).

Figura 6. Análisis de la ratio entre diferentes poblaciones de podocitos y el número total de células en orina 24 horas. Determinación de la ratio podocito/ células totales y porcentaje de cambio en b) ratio de podocitos totales/ células totales, c) ratio de podocitos

mononucleados/ células totales, d) ratio de podocitos binucleados/ células totales, e) ratio de podocitos binucleados pequeños/ células totales, y f) ratio de podocitos binucleados grandes/ células totales, mediante citometría de flujo usando como marcadores anti-nefrina y anti-lamina. SBP: podocitos binucleados pequeños. LBP: podocitos binucleados grandes.

- 5 IMC: Índice de Masa Corporal. HTA: Hipertensión. ACR: cociente albúmina/ creatinina. Las barras grises indican la media para cada grupo. Cada paciente y cada individuo control se representa de manera individual. ● para DELGADOS; ■ para OBS y ▲ para OAS. Se realizó una prueba t no pareada para comparar OBS frente a DELGADOS (* valor de $p \leq 0,05$; ** valor de $p \leq 0,01$). Se utilizó ANOVA de medidas repetidas para comparar OAS vs
- 10 OBS (ns: no significativo, \$ valor de $p \leq 0,01$; \$\$ valor de $p \leq 0,01$; \$\$\$ valor de $p \leq 0,001$).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

- 15 Tal y como se indica más arriba, la presente invención enseña un protocolo no invasivo para la detección de la presencia de podocitos en la orina de pacientes con obesidad, donde el método se basa en la detección de los marcadores nefrina y lamina A, y en la determinación de la ratio entre el número de podocitos y el número total de células encontradas en las muestras de orina.

- 20 Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para predecir el riesgo de daño renal en un individuo, donde el método comprende determinar la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en una muestra de orina obtenida de dicho individuo, donde un incremento de la ratio de podocitos binucleados frente a células totales con respecto a un valor de referencia es indicativo de un riesgo aumentado de que el paciente
- 25 sufra daño renal.

- En el contexto de la invención, el término “daño renal” se refiere a una situación patológica en la que el riñón pierde su capacidad para eliminar desechos y conservar electrolitos en la sangre y concentrar la orina. La intención del método de la invención es la detección
- 30 precoz del daño renal antes de que aparezca la proteinuria (que es el biomarcador de daño renal primero, pero más tardío) de tal manera que la de detección precoz de la insuficiencia renal crónica permita intentar utilizar algún tipo de terapia precozmente. En modos de realización de la invención, el término daño renal se puede referir a nefropatías crónicas proteinúricas. En el contexto de la invención, el término daño renal se puede referir, de
- 35 manera no exhaustiva, a pacientes con patologías hereditarias (poliquistosis, colagenopatías, enfermedades por depósito...), enfermedades sistémicas como la

diabetes, obesidad, hipertensión arterial, cuya primera manifestación renal es la albuminuria o proteinuria (biomarcador tardío) y precisamos de marcadores precoces como la podocituria. Así, en modos particulares de realización la presente invención se refiere a diagnóstico precoz de la lesión renal antes de la aparición de biomarcadores clásicos como la albuminuria y proteinuria, tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de las patologías previas.

El experto en la materia comprenderá que no es necesario que la predicción del riesgo de sufrir daño real sea correcto para todos los sujetos (es decir, para el 100% de los sujetos). Sin embargo, el término requiere permitir la identificación de una parte estadísticamente significativa de los sujetos (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohortes). El experto en la materia puede determinar si una parte es estadísticamente significativa utilizando diversas herramientas ya conocidas de evaluación estadística. En modos de realización de la presente invención, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99% de los sujetos de una población pueden identificarse adecuadamente mediante el método de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, el término “podocito” se refiere a las células en la capa visceral de la cápsula de Bowman en los riñones que poseen estructuras especializadas en forma de prolongaciones llamadas pedicelos. Los pedicelos envuelven los capilares del glomérulo y que dejan hendiduras entre ellos por donde se produce la filtración sanguínea. Los podocitos son células terminalmente diferenciadas que carecen de la capacidad de proliferar. Sin embargo, durante la lesión renal o el estrés, estas células pueden volver a entrar en el ciclo celular, donde el material nuclear se replica, pero la célula no se divide. Es decir, se produce la cariocinesis, pero no se llega a completar la citocinesis. Como consecuencia, se pueden identificar podocitos binucleados y multinucleados en biopsias renales de pacientes con diversas enfermedades renales (Mühldorfer et al., Binucleation of podocytes is uniformly accompanied by foot processes widening in renal disease, *Nephrol Dial Transplant* (2018) 33: 796–803). Los podocitos binucleados se pueden clasificar en dos tipos, de acuerdo con su tamaño y de acuerdo con su contenido en el marcador lamina A en estudios de citometría de flujo: podocitos binucleados pequeños (SBP) y podocitos binucleados grandes (LBP). En modos particulares de realización de la presente invención, la ratio de podocitos binucleados frente a células totales es:

- la ratio de podocitos binucleados totales frente a células totales;
- la ratio de podocitos binucleados pequeños (SBP) frente a células totales; y/o

- la ratio de podocitos binucleados grandes (LBP) frente a células totales.

Los podocitos binucleados se caracterizan por expresar, entre otros marcadores, nefrina y lamina A. En el contexto de la invención, el término “nefrina” se refiere a una proteína transmembrana codificada por el gen NPHS1, con número de referencia ENSG00000161270 en la base de datos Ensembl (para humano). El marcador nefrina se usa en el contexto de la invención para identificar de manera genérica todas las poblaciones de podocitos. En el contexto de la invención, el término “lamina A” se refiere a una proteína nuclear, dentro de una familia de proteínas también conocidas como filamentos intermedios de clase V, que interaccionan con proteínas de membrana para formar la lámina nuclear, en la cara interior de la envoltura nuclear. La lamina A es codificada por el gen LMNA (también conocido como CMD1A, HGPS, LGMD1B, LMN1, LMNL1, MADA, o PRO1), con número de referencia ENSG00000160789 en la base de datos Ensembl (para humano). El marcador lamina A se usa en el contexto de la invención para discriminar entre las distintas poblaciones de podocitos, de tal manera que este marcador permite identificar podocitos binucleados. La elección de lamina A como marcador se debe a que las células no proliferativas presentan una mejor expresión de laminas. Por este motivo, la expresión de laminas se produce particularmente en los podocitos que, por lesión renal, vuelven a entrar en el ciclo celular. Así, el contenido de lamina A parece estar asociado con el contenido de ADN, lo que sugiere un aumento en los niveles de lamina A para facilitar la cariocinesis en podocitos bi y multinucleados.

En modos particulares de realización de la presente invención, la ratio de podocitos binucleados frente a células totales se determina por cualquier técnica conocida para el experto en la materia, como, por ejemplo, microscopía y citometría de flujo. En un modo concreto de realización, la ratio de podocitos binucleados frente a células totales se determina por citometría de flujo.

Así, la invención también se refiere a un método para detectar podocitos binucleados en una muestra biológica por citometría de flujo, donde el método comprende: (a) detectar podocitos mediante el marcador nefrina en la muestra biológica; (b) detectar podocitos binucleados mediante el marcador lamina A en la población positiva para nefrina en la muestra biológica; (c) discriminar las distintas poblaciones de podocitos binucleados en función de su tamaño y de su contenido en el marcador lamina A. La muestra biológica es una muestra de orina. El método para detectar podocitos binucleados se puede implementar con el uso de anticuerpos. Así, el anticuerpo anti-nefrina se usa para detectar

podocitos por citometría de flujo, mientras que el anticuerpo anti-lamina A se usa como marcador para identificar podocitos binucleados.

En el contexto de la presente invención, el término "individuo" se puede referir, de manera general, a un sujeto sano que todavía no ha mostrado síntomas clínicos de enfermedad, o a un paciente que ya ha mostrado síntomas clínicos de enfermedad. En el contexto de la invención, el término individuo puede referirse a un mamífero, preferiblemente un humano, de cualquier edad o raza. En un modo de realización particular, el individuo es un paciente que sufre de obesidad, un paciente obeso. En un modo de realización preferido, el individuo no ha sido diagnosticado con daño renal antes de la realización del método según el primer aspecto de la invención. Tal y como se usa en el presente documento, el término "muestra" o "muestra biológica" significa material biológico aislado de un sujeto, donde el material biológico es orina. En el contexto de la invención, la muestra de orina puede ser una muestra puntual de orina, orina de primer chorro, primera orina de la mañana, estudio de orina de 24 horas o un sedimento urinario. En un modo particular de realización de la presente invención, la muestra de orina es un estudio de orina de 24 horas.

Los métodos de la invención comprenden comparar la ratio de podocitos binucleados frente a células totales con respecto a un valor de referencia. "Valor de referencia", de acuerdo con la presente invención, se refiere a un valor de laboratorio que se usa como referencia para los valores y/o los datos obtenidos por exámenes de laboratorio de los sujetos o de las muestras recolectadas de los sujetos en estudio. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto; un valor relativo; un valor que tiene un límite superior y/o inferior; un rango de valores; un valor medio; un valor mediano, o un valor en comparación con un control particular o con una referencia. Un valor de referencia puede basarse en un valor de muestra individual, como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra de un único sujeto sano, sin síntomas clínicos de la enfermedad. El valor de referencia se puede basar en un gran número de muestras, como de la población de sujetos del grupo de edad cronológica coincidente. A la hora de determinar el valor de referencia, es necesario tener en cuenta consideraciones entre las que se encuentran la edad, el peso, el sexo, el estado físico general del paciente y/o similares. Por ejemplo, se puede tomar como grupo de referencia cantidades iguales de muestra de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100, o al menos 1000 sujetos o más, preferentemente clasificados según las consideraciones anteriores, por ejemplo, según diversas categorías de edad.

En un modo de realización de la invención, el valor de referencia es la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en muestras de orina de sujetos delgados, donde se considera que un sujeto es delgado si tiene un índice de masa corporal inferior a 25 kg/m².

5 Una vez que se establece un valor de referencia, el valor de la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en orina se puede comparar con dicho valor de referencia y, por lo tanto, se le puede asignar un nivel de "incrementado" o "disminuido". Por ejemplo, un aumento en los valores de la ratio por encima del valor de referencia de al menos 1,1 veces, 1, 2 veces, 1, 3 veces, 1, 4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1, 7 veces, 1,8
10 veces, 1,9 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces o incluso más en comparación con el valor de referencia se considera como un valor "incrementado". Por otro lado, una disminución en los valores de la ratio por debajo del valor de referencia de al menos 0,9 veces, 0,8 veces, 0,7 veces, 0,6 veces, 0,5 veces, 0,4 veces, 0,3 veces, 0,2 veces, 0,1 veces o incluso menos en comparación con el valor de referencia se considera
15 como un valor de la ratio "disminuido". Así, de acuerdo con la presente invención, se considera que existe un incremento de la ratio de podocitos binucleados frente a células totales con respecto a un valor de referencia si el valor de la ratio de la muestra es al menos un 10% mayor, al menos un 20% mayor, al menos un 30% mayor, al menos un 40% mayor, al menos un 50% mayor, al menos un 75% mayor, al menos un 100% mayor, al menos un
20 200% mayor, al menos un 300% mayor, al menos un 400% mayor, o al menos un 500% que el valor de la ratio de la referencia. En el contexto de la presente invención, valores superiores a 0.20 podocitos totales/ células totales, 0.10 podocitos binucleados/ células totales, 0.06 podocitos SBP/ células totales, o 0.02 podocitos LBP/ células totales en muestras de orina son indicativos de daño renal.

25

En el contexto de la invención, el término "riesgo aumentado de que el paciente sufra daño renal" o "riesgo aumentado de daño renal" indica que se espera, es decir, se predice que el sujeto padecerá, o corre un alto riesgo de padecer daño renal dentro de un período de tiempo establecido. El término "alto" es un término relativo y, en el contexto de esta
30 solicitud, se refiere al riesgo del grupo con valores incrementados de la ratio de podocitos binucleados frente a células totales con respecto a un resultado clínico (manifestaciones clínicas de daño renal). Un riesgo "alto" puede considerarse como un riesgo mayor que el riesgo promedio para una población heterogénea. El riesgo también variará en función del período de tiempo. El período de tiempo puede ser, por ejemplo, un año, dos años, tres
35 años, cuatro años, cinco años, diez años, quince años o incluso veinte años desde que se hizo el pronóstico.

En un modo de realización preferido, el método de acuerdo con este primer aspecto de la invención comprende además la determinación de uno o más parámetros clínicos que también son indicativos del daño renal. Dichos indicadores incluyen la presencia o los niveles de biomarcadores: (1) Epidemiológicos (edad, sexo, raza); (2) Clínicos (Diabetes, HTA, dislipidemia, tabaco, disminución de masa renal, enfermedad familiar renal, obesidad, síndrome metabólico, etc), (3) Analíticos: creatinina sérica, FGR, albuminuria y/o proteinuria).

- 10 En condiciones normales se filtran en el glomérulo proteínas de bajo peso molecular y pequeñas cantidades de albúmina. La mayoría de las proteínas filtradas son reabsorbidas y catabolizadas en el túbulo proximal y sólo una mínima cantidad es excretada en orina. También se eliminan en orina proteínas excretadas por las células tubulares. La excreción normal de proteínas totales en orina es 150 mg/24h y se considera la presencia de
- 15 albuminuria si su eliminación es > 30 mg/24h.

- En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para seleccionar a un individuo para recibir tratamiento para prevenir el daño renal, donde el método comprende determinar la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en una muestra de
- 20 orina obtenida de dicho individuo, donde un incremento de la ratio de podocitos binucleados frente a células totales con respecto a un valor de referencia es indicativo de que el paciente es seleccionado para recibir tratamiento preventivo para el daño renal, preferiblemente daño renal temprano. De manera complementaria, la invención se refiere a un método para el tratamiento preventivo de daño renal en un individuo, donde el método comprende la
- 25 administración de una terapia a dicho individuo, y donde el paciente se ha seleccionado por un método de acuerdo con la presente invención.

- En el contexto de la invención, el término “tratamiento” y/o “terapia” se refiere a medios de cualquier tipo, ya sean medios higiénicos, medios dietéticos, medios farmacológicos, medios quirúrgicos, o medios físicos que se emplean con la intención de prevenir, curar y/o
- 30 aliviar una enfermedad, dolencia o patología, o los síntomas asociados a ellas. En el caso concreto del daño renal, se pueden utilizar una variedad de tratamientos para tratar la lesión renal y evitar la progresión. El tratamiento para el daño renal puede incluir, de manera no limitativa, un tratamiento farmacológico (por ejemplo, un tratamiento que comprende la administración de un fármaco dirigido a la obesidad como un inhibidor SGLT2
- 35 o incretinas: agonistas de los receptores GLP1, tirzepatida; la administración de fármacos

con acción anti-proteinuria como medicamentos de bloqueo del sistema renina-angiotensina-aldosterona (IECA, ARA-2, antagonistas del receptor de los mineralocorticoides), un tratamiento quirúrgico (por ejemplo, cirugía bariátrica), o similar. En un modo de realización de la invención, el paciente seleccionado por el método de la invención se somete a una cirugía bariátrica.

Así, la presente invención también se refiere a un método para el tratamiento preventivo de daño renal en un individuo, donde el método comprende:

- determinar la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en una muestra de orina obtenida de dicho individuo, donde un incremento de la ratio de podocitos binucleados frente a células totales con respecto a un valor de referencia es indicativo de un riesgo aumentado de que el paciente sufra daño renal;
- someter al individuo a cirugía bariátrica si el paciente sufre de daño renal, de acuerdo con la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en la muestra de orina obtenida de dicho individuo.

En un modo de realización, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento preventivo de daño renal en un individuo, donde el método comprende:

- determinar la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en una muestra de orina obtenida de dicho individuo, donde un incremento de la ratio de podocitos binucleados frente a células totales con respecto a un valor de referencia es indicativo de un riesgo aumentado de que el paciente sufra daño renal;
- determinación de uno o más parámetros clínicos que también son indicativos del daño renal, donde dichos indicadores incluyen la presencia o los niveles de marcadores de daño renal ya conocidos, o pueden ser indicadores clínicos o patológicos (por ejemplo, sexo, edad, índice de masa corporal (IMC), glucosa, triglicéridos, diabetes, dislipidemia, hipertensión, urea, albúmina, creatinina, ratio albúmina/ creatinina, antecedentes familiares y similares).
- someter al individuo a cirugía bariátrica si el paciente sufre de daño renal, de acuerdo con la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en la muestra de orina obtenida de dicho individuo y los parámetros clínicos analizados en el mismo individuo.

De manera adicional, la invención se refiere a un kit para predecir el riesgo de daño renal en un individuo, donde el kit comprende reactivos adecuados para detectar la presencia de células caracterizadas por ser positivas para el biomarcador nefrina y para el biomarcador lamina A en una muestra de orina de dicho individuo, donde dichos reactivos comprenden

al menos el 10% de los reactivos presentes en el kit. En modos particulares de realización de la invención, los reactivos adecuados para detectar la presencia de células caracterizadas por ser positivas para el biomarcador nefrina y el biomarcador lamina A en una muestra de orina de un individuo comprenden al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99%, o el 100% de la cantidad total de reactivos adecuados para la detección de las células positivas para nefrina y lamina A que forman el kit. En modos particulares de realización de la invención, los reactivos adecuados para detectar la presencia de las células son reactivos adecuados para detectar la presencia de las células por citometría de flujo. En modos de realización de la invención, el reactivo adecuado para detectar el biomarcador nefrina y donde el reactivo para detectar el biomarcador lamina A se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un derivado de anticuerpo (por ej., minibody, nanoanticuerpo, fragmento Fab, fragmento Fv de cadena sencilla, etcétera), una lectina, un aptámero, y combinaciones de los mismos. En modos particulares de realización de la invención, el kit comprende adicionalmente reactivos para detectar otros indicadores de daño renal, tales como glucosa, triglicéridos, albúmina en urea, creatinina en urea, ratio albúmina/ creatinina, y combinaciones de los mismos. En modos particulares de realización de la invención, el kit comprende adicionalmente reactivos para detectar la concentración de proteína en una muestra de orina de dicho individuo, donde la proteína es preferiblemente albúmina.

La invención también se refiere al uso de un kit de acuerdo con la presente invención, para predecir el riesgo de daño renal en un individuo. Así, la invención se refiere al uso de la nefrina y/o la lamina A como marcadores para predecir el riesgo de daño renal en un individuo.

En un último aspecto, la invención se refiere a un uso de la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en una muestra de orina obtenida de un individuo como marcador para predecir el riesgo de daño renal.

Todos los términos y modos de realización descritos anteriormente son aplicables a cualquier aspecto y modo de realización de la invención. De acuerdo con la presente invención, el término en singular "el", "la", "un", "uno", "una", se refiere igualmente a su correspondiente en plural "los", "las", "unos", "unas", salvo que se desprenda del contexto que claramente el término se refiere a una especie en el singular. El término "comprende" o "que comprende", tal y como se usa en el presente documento, también describe

"consiste en" o "que consiste en" de acuerdo con la práctica de patentes generalmente aceptada.

EJEMPLOS

5

La siguiente invención se describe por medio de los siguientes ejemplos, que deben interpretarse como meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

Ejemplo 1. Materiales y métodos

10

1.1. Diseño y colección de muestras

Este estudio fue diseñado para evaluar el efecto de la pérdida de peso en pacientes con obesidad que se sometieron a cirugía bariátrica (CB). El Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario 12 de Octubre y la Universidad Rey Juan Carlos (URJC) han evaluado el proyecto y han considerado que los requisitos éticos necesarios del protocolo son los adecuados para realizar el estudio.

Los sujetos delgados (grupo control) fueron seleccionados de acuerdo con los siguientes criterios: (i) IMC = 20-25 kg/m²; (ii) diferencias no significativas en la edad en comparación con los pacientes con obesidad antes de la cirugía bariátrica (OBS). Los criterios de elegibilidad de los pacientes con OBS consistieron en Índice de Masa Corporal (IMC) > 35 kg/m², filtración glomerular estimada (FGe) > 60 ml/min y/o proteinuria < 0,30 g/24 h, no recibieron ningún medicamento que interfiriera con las variables estudiadas y fueron emparejados en edad con los individuos del grupo control (sujetos delgados). El grupo de pacientes OBS no presentó insuficiencia renal ni proteinuria.

Finalmente, se recogió orina de 24 horas de 12 sujetos delgados (IMC= 22.82±2.38 kg/m²) y 20 pacientes con obesidad antes de la cirugía bariátrica (OBS). La pandemia de Covid-19 tuvo un efecto perjudicial en el seguimiento de algunos de estos pacientes, por lo que solo se pudo recoger muestra de orina de 11 pacientes 1 año después de la cirugía bariátrica (OAS). Este estudio muestra los resultados obtenidos de estos 11 pacientes que pudieron ser seguidos.

35

1.2. Preparación de la muestra

Las muestras de orina de los pacientes OBS, OAS y de los individuos delgados (grupo control) se dividieron en alícuotas, se centrifugaron y el sedimento remanente se fijó con paraformaldehído, PFA (ThermoFisher, EE. UU.) al 4 %. Se tiñeron 300 µl de muestra fijada con Syto13TM (ThermoFisher, EE. UU.) junto con perlas de recuento (CountBrightTM Absolute Counting Beads, Invitrogen, EE. UU.) para determinar el número total de células en la muestra.

Se separó el volumen de muestra pertinente para obtener 200 000 células en la probeta. La muestra se incubó con Triton X-100 al 0,2 %, luego bloqueador de la región Fc de anticuerpo (RayBright® Human FcR Block, RayBiotech, EE. UU.) e isotipos coincidentes (Bioss, EE. UU.). La muestra se incubó con anti-nefrina conjugada con AlexaFluor 647 (Bioss, EE. UU.) y anti-lamina A conjugada con FITC (Nordic-MUbio, Países Bajos). Se agregaron perlas de recuento al tubo de ensayo y se analizaron en un citómetro de flujo (BeckmanCoulter, EE. UU.). Se estableció un umbral de tamaño para evitar la detección de vesículas mediante perlas de 2 µm (BeckmanCoulter, EE. UU.).

1.3. Análisis estadístico

El análisis citómetro se llevó a cabo a través del software CXP (BeckamnCoulter, EE. UU.). Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 5. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. La significación estadística entre los grupos se analizó mediante ANOVA de dos vías. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. * valor de $p \leq 0,05$ frente a los sujetos delgados (DELGADOS); ** valor de $p \leq 0,01$ frente a los sujetos delgados (DELGADOS); *** valor de $p \leq 0,001$ frente a sujetos delgados (DELGADOS). \$ valor $p \leq 0,05$ vs los pacientes con obesidad; \$\$ $p \leq 0,01$ vs los pacientes con obesidad; \$\$\$ $p \leq 0,001$ vs los pacientes con obesidad; \$\$\$\$ $p \leq 0.0001$ vs los pacientes con obesidad.

Ejemplo 2. Resultados

2.1. Detección de diferentes poblaciones de podocitos en orina de pacientes con obesidad.

Se recogió, fijó y analizó la orina de 24 horas de los sujetos participantes en el estudio mediante citometría de flujo. Para ello, se utilizó un control negativo para determinar la fluorescencia basal en la orina. Teniendo en cuenta dicho control, se analizó la muestra de orina marcada mediante dos marcadores, y se obtuvo la representación “forward versus

side scatter” (FSC vs SSC, Figura 1A) de donde se seleccionó una representación mediante dos marcadores, con anticuerpos anti-nefrina (conjugado con Alexa 647) y anti-lamina A (conjugado con FITC), de entre todos los eventos presentes en la muestra de orina (Figura 1B). Se descartaron los eventos negativos para anti-nefrina y anti-lamina A.

- 5 Dentro de esta población marcada como nefrina positiva (nefrina+), se identificaron tres poblaciones con diferentes tamaños celulares al analizar el contenido de lamina A frente al tamaño celular determinado en el eje FSC-A (Figura 1C). Para hacer más clara su identificación, se evaluó la complejidad de la muestra en el eje SSC-A en lugar del tamaño en el eje FSC-A (Figura 1D). Se etiquetaron estas tres poblaciones como lamina +, lamina ++ y lamina +++ (Figura 1D). Con el fin de discriminar las células con un mayor contenido de lamina A de los dobletes, se seleccionaron específicamente los singletes en cada población en una representación FSC-H vs FSC-A (Figura 1E). Después de la selección de singletes, se combinaron dichos singletes en un único diagrama y se analizaron los eventos restantes (Figura 1F). Las poblaciones encontradas se clasificaron, en una
- 15 representación SSC-A vs anti-lamina A, de la siguiente manera (Figura 1F):
- nefrina+/ lamina A+, como podocitos mononucleados;
 - nefrina+/ lamina A++ (alto contenido en lamina A), como Podocitos Binucleados Pequeños o SBP; y
 - nefrina+/ lamina A+++ (muy alto contenido en lamina A, mayor tamaño), como
- 20 Podocitos Binucleados Grandes o LBP.

Para confirmar la detección de podocitos binucleados, se determinó que los podocitos clasificados como lamina A++ (SBP) y lamina A+++ (LBP) exhibían un mayor contenido de ADN (Figura 2A). Además, dado que es obligatorio que el contenido de lamina A disminuya

25 para permitir la apoptosis, se llevó a cabo un experimento para relacionar el contenido de lamina A y anexina V y no se encontró una relación inversa (Figura 2B). Por lo tanto, el incremento en niveles de lamina A no está relacionado con la apoptosis en este tipo de células.

30 2.2. Podocitos en orina de 24 horas, normalizado frente a volumen de orina o frente a mg de creatinina

El volumen de las muestras de orina en 24 horas de individuos delgados (sujetos control) y pacientes (OBS y OAS) está aproximadamente entre los 1000-3000 ml (Figura 3A).

35

Se contó el número total de podocitos en 24 horas en dichas muestras de orina, para cada paciente y para cada individuo control (Figura 3B). Además, se analizaron las poblaciones concretas de podocitos para diferenciar el número de podocitos mononucleados (Figura 3C) del número de podocitos binucleados (Figura 3D). Dentro de los podocitos binucleados, se diferenció entre el número de podocitos binucleados pequeños, o SBP (Figura 3E), y el número de podocitos binucleados grandes, o LBP (Figura 3F).

Al disponer de datos de volumen de orina en 24 horas, los valores encontrados en las figuras 3B-3F se normalizaron para determinar la concentración, de tal manera que se puede obtener la concentración total de podocitos en 24 horas en dichas muestras de orina, para cada paciente y para cada individuo control (Figura 4A). Además, se analizaron las poblaciones concretas de podocitos para diferenciar la concentración de podocitos mononucleados (Figura 4B) de la concentración de podocitos binucleados (Figura 4C). Dentro de los podocitos binucleados, se diferenció entre la concentración de podocitos binucleados pequeños, o SBP (Figura 4D), y la concentración de podocitos binucleados grandes, o LBP (Figura 4E).

De manera adicional, se determinó la cantidad de creatinina excretada en la orina en 24 horas para individuos delgados (sujetos control) y pacientes (OBS y OAS). Estos valores estuvieron, aproximadamente, entre 400-4500 mg de creatinina (Figura 5A). Estos valores permitieron normalizar los resultados de número total de podocitos en función de la creatinina excretada en la orina de 24 horas (Figura 5B). Además, se analizaron las poblaciones concretas de podocitos para diferenciar el número de podocitos mononucleados por mg de creatinina (Figura 5C) del número de podocitos binucleados por mg de creatinina (Figura 5D). Dentro de los podocitos binucleados, se diferenció entre el número de podocitos binucleados pequeños, o SBP, por mg de creatinina (Figura 5E), y el número de podocitos binucleados grandes, o LBP, por mg de creatinina (Figura 5F).

Estos resultados muestran que los pacientes obesos antes de la cirugía bariátrica (OBS) exhiben una mayor cantidad de podocitos binucleados comparado con los sujetos control (Figuras 3D, 4C, 5D). Se observa también que el número de podocitos binucleados en los pacientes OAS se incrementa en comparación con los pacientes OBS (Figura 3D), lo que contradice las expectativas con respecto a la recuperación de los parámetros renales después de la cirugía bariátrica, donde el presente estudio confirmó el efecto protector renal de la cirugía bariátrica en los pacientes obesos un año después de la intervención (véase la tabla 1, a continuación).

Tabla 1: Diferencias en los parámetros clínicos entre los participantes en el estudio.

	DELGADOS	OBS	OAS
N	12	11	
Sexo	6 hombres y 6 mujeres	6 hombres y 5 mujeres	
Edad (años)	46,6±2,7	50,3±3,7	51,3±3,7
IMC (kg/m²)	23,31±0,47	43,36±1,64	27,94±1,42
Glucosa (mg/dL)	77,16±1,27	114,9±9,9	96,1±7,5
Diabéticos	n=0 (0%)	n=2 (18%)	n=2 (18%)
Tratamiento antidiabetes	n=0 (0%)	n=2 (18%)	n=2 (18%)
Triglicéridos (mg/dL)	64,6±4,26	214,11±42,72	109,3±25,53
Dislipidemia	n=0 (0%)	n=5 (45%)	n=1 (9%)
Tratamiento disminución lípidos	n=0 (0%)	n=1 (9%)	n=4 (36%)
HTA	n=0 (0%)	n=3 (27%)	n=3 (27%)
Tratamiento HTA	n=0 (0%)	n=3 (27%)	n=3 (27%)
Creatinina en orina (mg/dL)	109,68±22,28	8,21±4,88	5,05±2,48
Albuminuria (mg/L)	3,20±1,48	8,21±4,88	5,05±2,48
ACR (mg/g)	5,03±0,84	9,79±2,03	7,06±1,71

IMC: índice de masa corporal; HTA: hipertensión; ACR: ratio albúmina/ creatinina.

- 5 Este resultado contradictorio con respecto a la situación clínica se repite al normalizar por volumen de orina (Figura 4C) o por mg de creatinina (Figura 5D) en las muestras de orina en 24 horas. Esto plantea la pregunta de si factores habituales de normalización en este campo técnico son siempre fiables, ya que pueden estar influenciado por múltiples factores.
- 10 2.3. Podocitos en orina de 24 horas, normalizado frente a células totales

Para abordar este problema, los inventores desarrollaron un nuevo método para normalizar los números de podocitos considerando el número total de células en la orina. Este enfoque

permite además utilizar indistintamente tanto muestras de orina puntual como muestras de orina de 24 horas, mejorando la flexibilidad en la recogida y análisis de las muestras.

5 Para determinar un nuevo factor de normalización independiente del volumen de orina o de los mg de creatinina, se normalizaron las diferentes poblaciones de podocitos con el número total de células encontradas en las muestras de orina en 24 horas.

En primer lugar, se encontró que, aunque no había cambios significativos en la ratio del número total de podocitos frente al número total de células entre pacientes OBS y el control, 10 sí que se observó una reducción significativa en la ratio del número total de podocitos frente al número total de células entre los pacientes OAS comparados con los pacientes OBS (Figura 6A). Esta reducción se debía principalmente a cambios en la presencia de podocitos binucleados, ya que la ratio del número de podocitos binucleados frente al número total de células en la muestra de orina se incrementó significativamente en 15 pacientes OBS comparados con los sujetos control (Figura 6C). En este caso, sí que se observó que los pacientes OAS exhibían una reducción en esta ratio frente a los pacientes OBS (Figura 6C), lo que se ajusta más adecuadamente con los resultados clínicos para estos pacientes (véase la tabla 1, más arriba). Estos cambios no se observaron para la población de podocitos mononucleados (Figura 6B). Cuando se estudiaron en detalle las 20 dos poblaciones de podocitos binucleados, se encontró que tanto la ratio de SBP frente al número total de células en orina como la ratio de LBP frente al número total de células en orina eran significativamente más altas en pacientes OBS comparadas con las ratios para los sujetos control (individuos delgados). Estas ratios decrecían para los pacientes obesos después de la cirugía bariátrica (OAS) (Figuras 6D, 6E). Los datos muestran que la ratio 25 de LBP frente al número total de células en orina puede ser menor en pacientes OAS comparados con sujetos control (Figura 6E), lo que tal vez se deba a la ausencia de un diagnóstico para daño renal activo en estos pacientes.

Conviene resaltar que en estos resultados se observa que solo la mitad de los pacientes 30 obesos presentó una reducción en la ratio patológica de podocitos binucleados frente a células totales en orina después de la cirugía bariátrica, mientras que la otra mitad no presentó dicha reducción (Figura 6C). Al analizar más en detalle ambos grupos, se encontró que aquellos pacientes que experimentaron una reducción en la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en orina después de la cirugía bariátrica eran más 35 jóvenes, tenían menos comorbilidades, y estas eran menos graves. Por el contrario, en pacientes de mayor edad con comorbilidades, la ratio de podocitos binucleados frente a

células totales en orina permanecía constante antes y después de la cirugía bariátrica. Las diferencias entre estos dos grupos de pacientes se muestran en la tabla 2, a continuación.

Tabla 2: Diferencias en los parámetros clínicos entre pacientes que presentan un valor de podocitos binucleados/ células totales elevado antes de la cirugía bariátrica (CB), que baja tras la cirugía, y pacientes que presentan un valor de podocitos binucleados/ células totales normal antes de la cirugía bariátrica (CB), que se mantiene igual tras la cirugía.

	Valor elevado de podocitos binucleados/ células totales, que baja tras la cirugía		Valor normal de podocitos binucleados/ células totales, igual tras la cirugía	
N	5		6	
Sexo	3 hombres y 2 mujeres		3 hombres y 3 mujeres	
Edad (años)	42,2±4,24		57,6±3,47	
	ANTES CB	DESPUÉS CB	ANTES CB	DESPUÉS CB
IMC (kg/m²)	43,8±1,34	26,58±1,34	43,36±1,64	27,94±1,42
Glucosa (mg/dL)	96,2±5,96	79,5±2,5	132,6±15,77	103,75±17,56
Diabéticos	n=0 (0%)	n=0 (0%)	n=2 (33%)	n=2 (33%)
Triglicéridos (mg/dL)	150,8±34,52	100±41	313,4±56,56	81,75±13,81
Dislipidemia	n=2 (40%)	n=0 (0%)	n=3 (50%)	n=1 (16%)
Tratamiento disminución lípidos	n=1 (20%)	n=1 (20%)	n=0 (0%)	n=3 (50%)
HTA	n=1 (20%)	n=1 (20%)	n=2 (33%)	n=2 (33%)
Albuminuria (mg/L)	3,10±1,97	2,03±2,03	6,38±3,57	8,06±4,18
ACR (mg/g)	7,96±1,57	5,30±1,59	11,62±3,81	8,83±3,01

IMC: índice de masa corporal; HTA: hipertensión; ACR: ratio albúmina/ creatinina.

- 10 Una hipótesis para explicar estos resultados entre los dos grupos de pacientes obesos presume que una duración prologada de complicaciones asociadas con la obesidad en los pacientes de mayor edad implicaría que la lesión renal podría haber persistido durante un período más largo en estos pacientes, lo que habría resultado en una mayor pérdida de podocitos en períodos anteriores a la toma de la muestra de orina en el presente estudio.

En consecuencia, la detección de podocituria mediante el método de la presente invención puede servir como un indicador útil para la detección en etapas tempranas del daño glomerular causado por la obesidad. Estos resultados del indicador están alineados con los datos clínicos observados para estos pacientes, lo que lleva a proponer esta estrategia

5 de normalización de las muestras de orina como una opción clínicamente más correcta que las otras alternativas evaluadas.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para predecir el riesgo de daño renal en un individuo, donde el método comprende:
5 – determinar la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en una muestra de orina obtenida de dicho individuo, donde un incremento de la ratio de podocitos binucleados frente a células totales con respecto a un valor de referencia es indicativo de un riesgo aumentado de que el paciente sufra daño renal.
10
2. Un método para seleccionar a un individuo para recibir tratamiento para prevenir el daño renal, donde el método comprende:
 – determinar la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en una muestra de orina obtenida de dicho individuo,
15 donde un incremento de la ratio de podocitos binucleados frente a células totales con respecto a un valor de referencia es indicativo de que el paciente es seleccionado para recibir tratamiento preventivo para el daño renal.
3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la ratio
20 de podocitos binucleados frente a células totales es:
 – la ratio de podocitos binucleados totales frente a células totales;
 – la ratio de podocitos binucleados pequeños (SBP) frente a células totales; y/o
 – la ratio de podocitos binucleados grandes (LBP) frente a células totales.
- 25 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dichos podocitos binucleados se caracterizan por expresar nefrina y lamina A.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la ratio de podocitos binucleados frente a células totales se determina por citometría de flujo.
30
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la muestra de orina es una muestra de orina en 24 horas.
7. Un método para detectar podocitos binucleados en una muestra biológica por
35 citometría de flujo, donde el método comprende:
 (a) detectar podocitos mediante el marcador nefrina en la muestra biológica;

(b) detectar podocitos binucleados mediante el marcador lamina A en la población positiva para nefrina en la muestra biológica;

(c) discriminar las distintas poblaciones de podocitos binucleados en función de su tamaño y de su contenido en el marcador lamina A,

5 donde la muestra biológica es una muestra de orina.

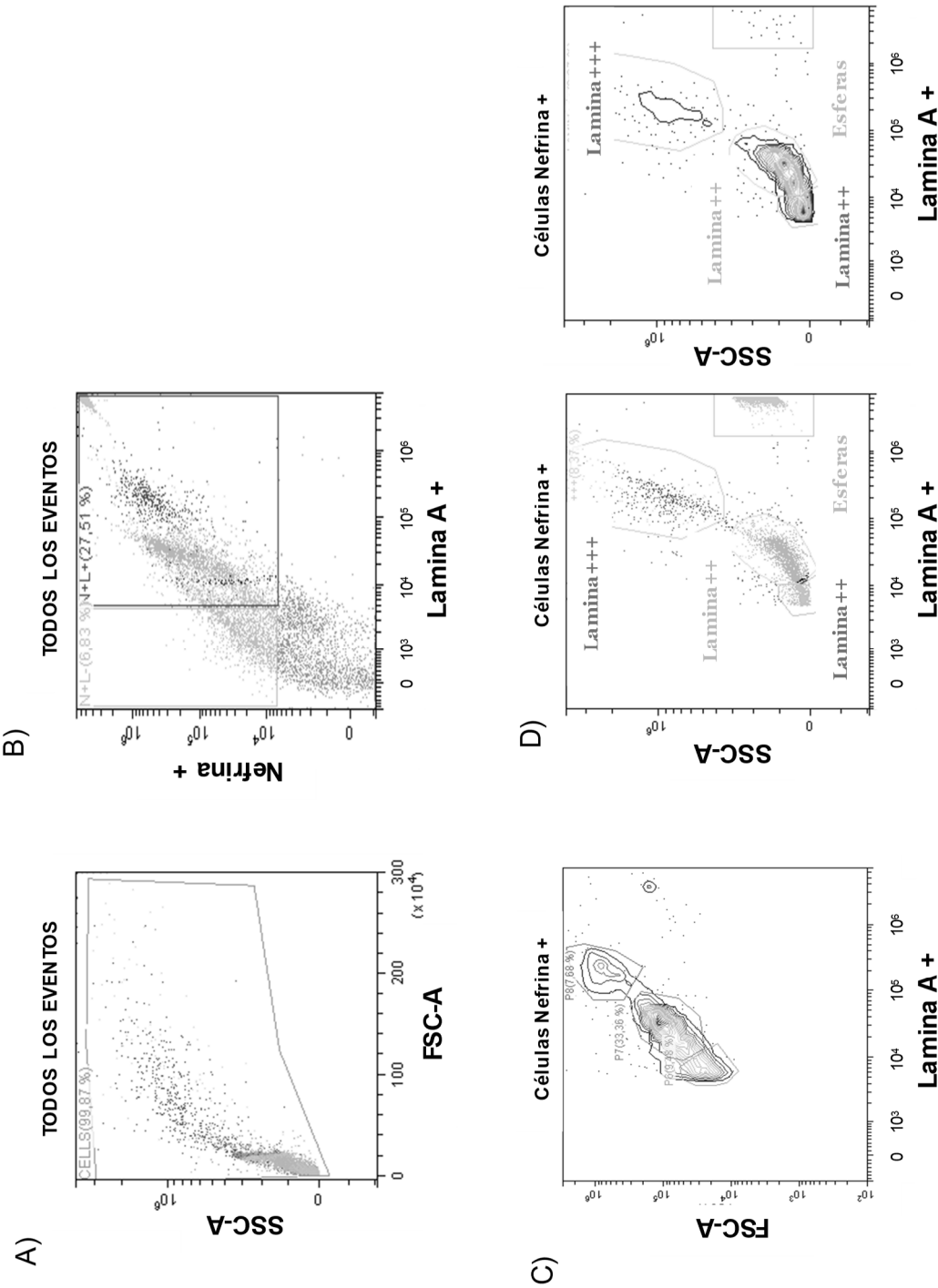
8. Un kit para predecir el riesgo de daño renal en un individuo, donde el kit comprende reactivos adecuados para detectar la presencia de células caracterizadas por ser positivas para el biomarcador nefrina y el biomarcador lamina A en una muestra de
10 orina de dicho individuo, donde dichos reactivos comprenden al menos el 10% de los reactivos presentes en el kit.

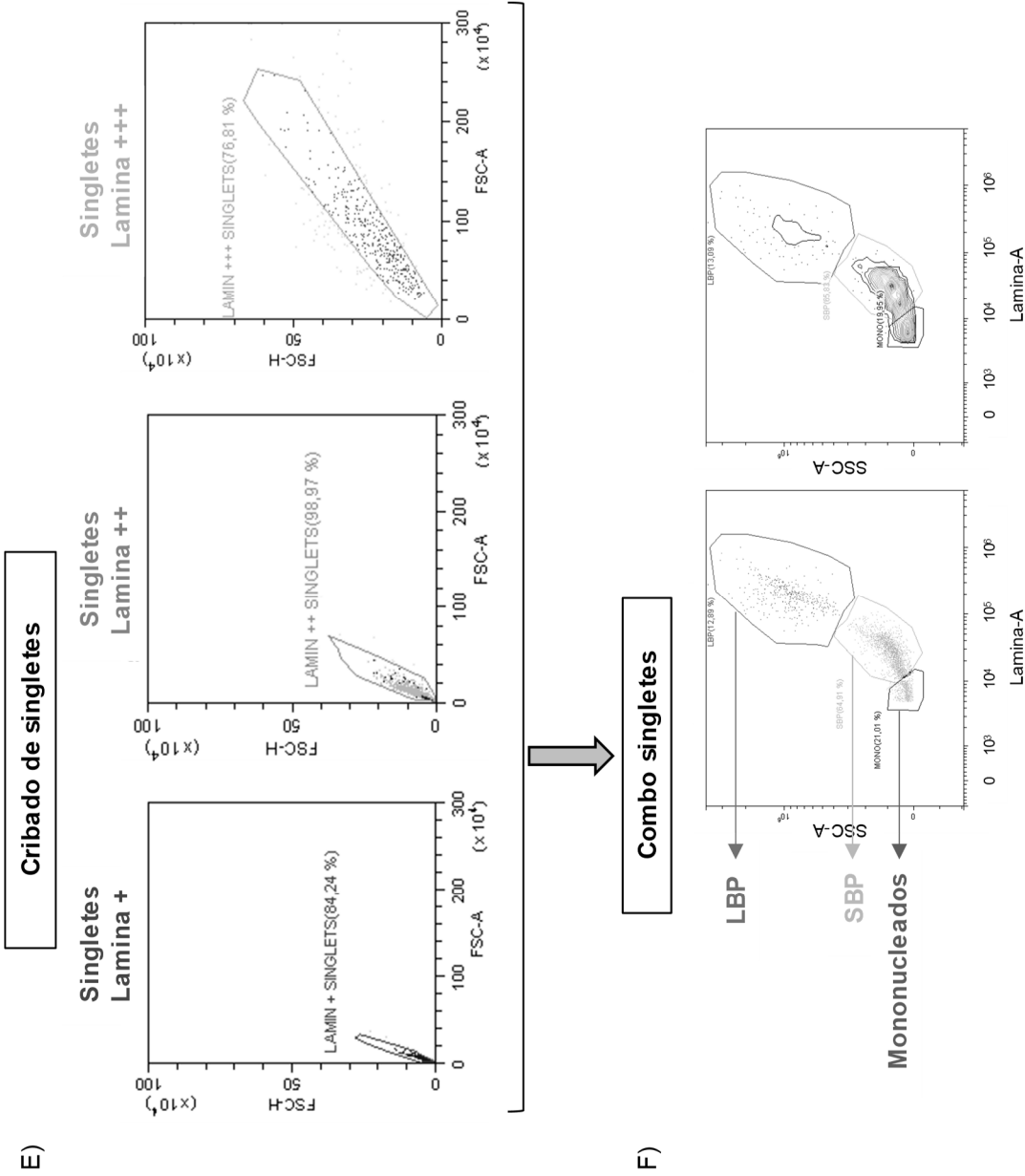
9. El kit de acuerdo con la reivindicación 8, donde los reactivos adecuados para detectar la presencia de las células son reactivos adecuados para detectar la presencia de las
15 células por citometría de flujo.

10. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, donde el reactivo para detectar el biomarcador nefrina y donde el reactivo para detectar el biomarcador lamina A se seleccionan del grupo que consiste en un anticuerpo, un derivado de
20 anticuerpo, una lectina, un aptámero, y combinaciones de los mismos.

11. Uso de un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para predecir el riesgo de daño renal en un individuo.

25 12. Uso de la ratio de podocitos binucleados frente a células totales en una muestra de orina obtenida de un individuo como marcador para predecir el riesgo de daño renal.





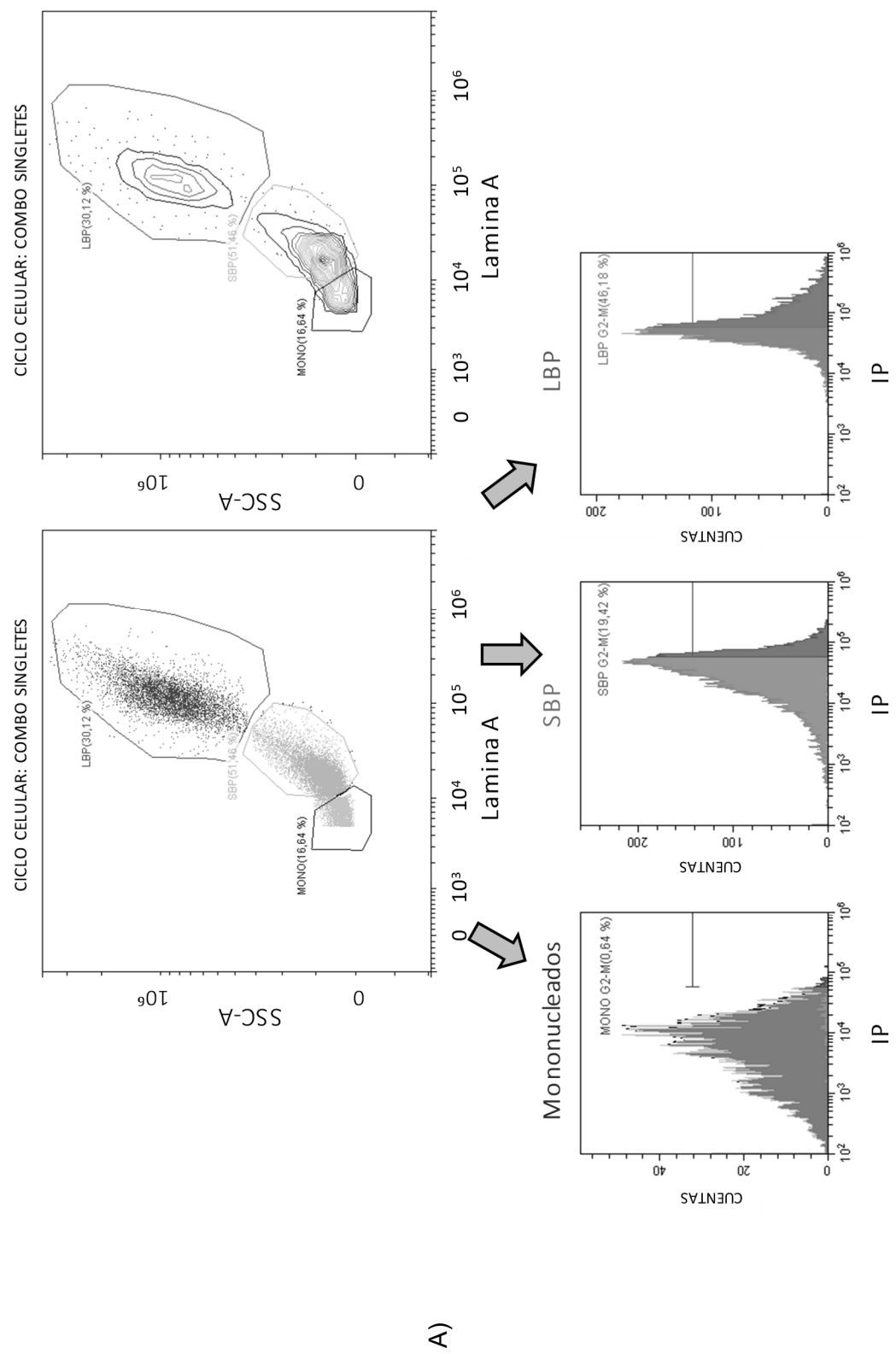


FIGURA 2

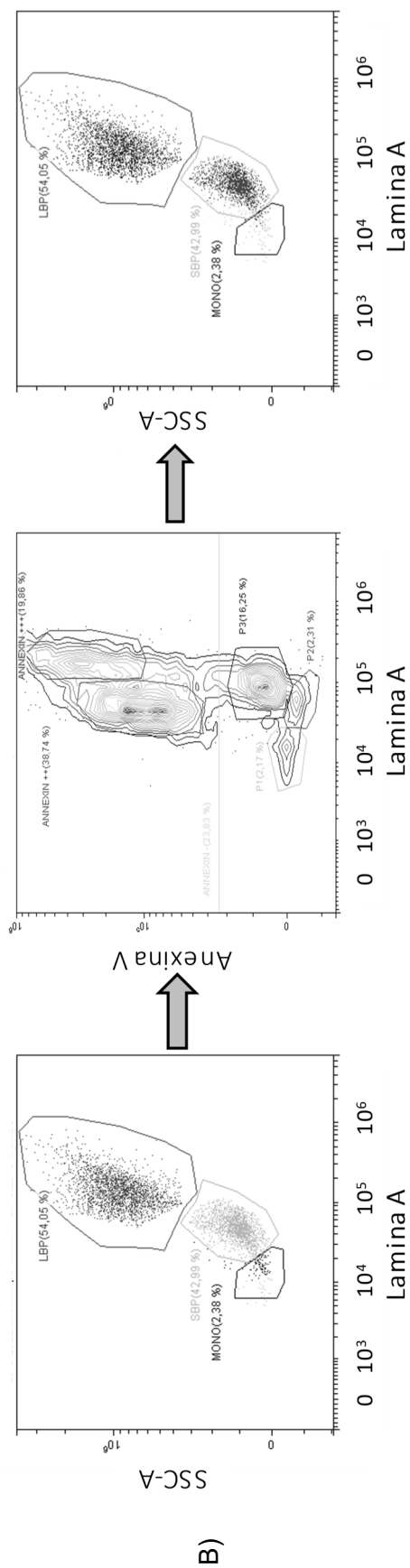


FIGURA 2

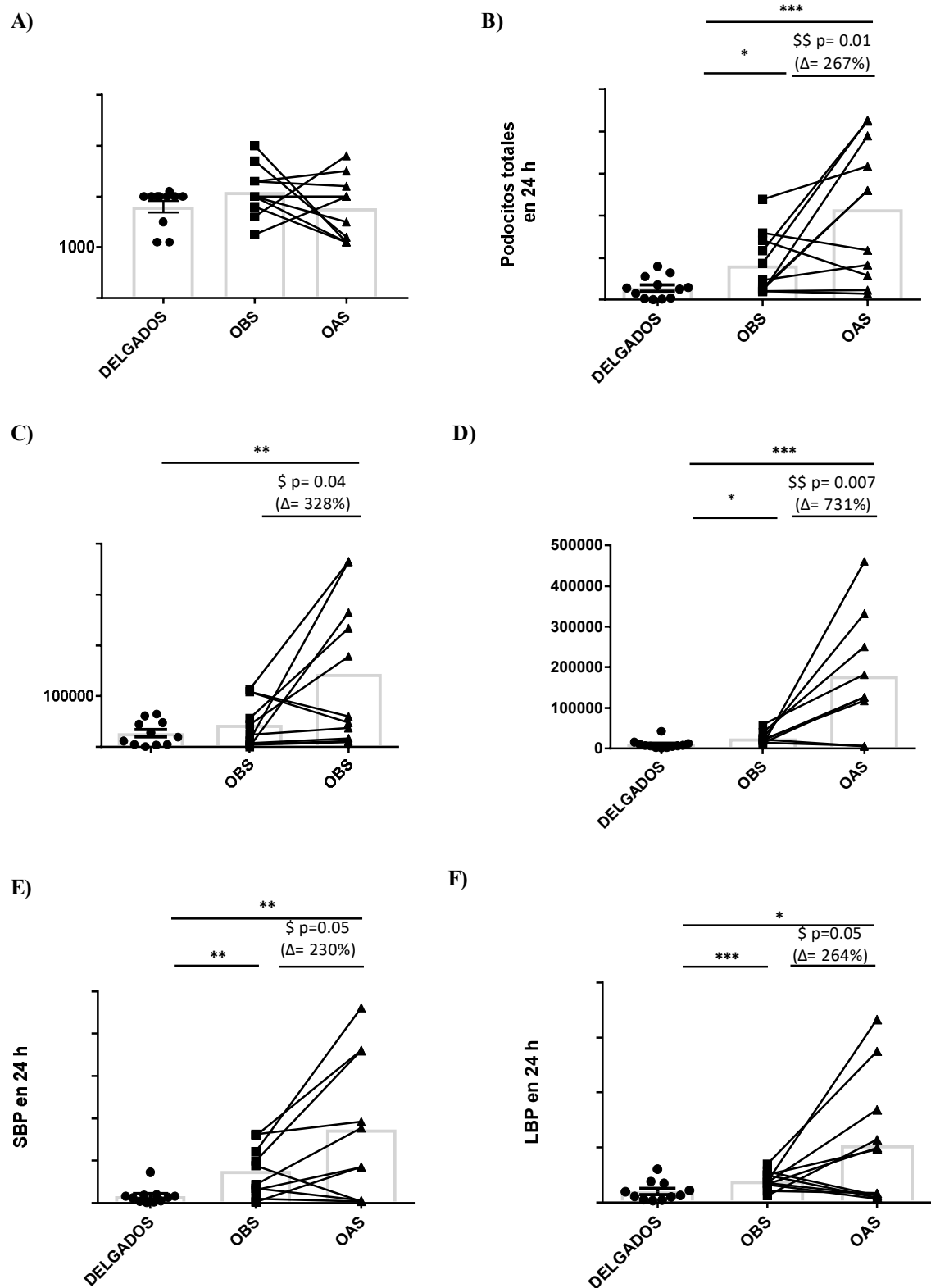


FIGURA 3

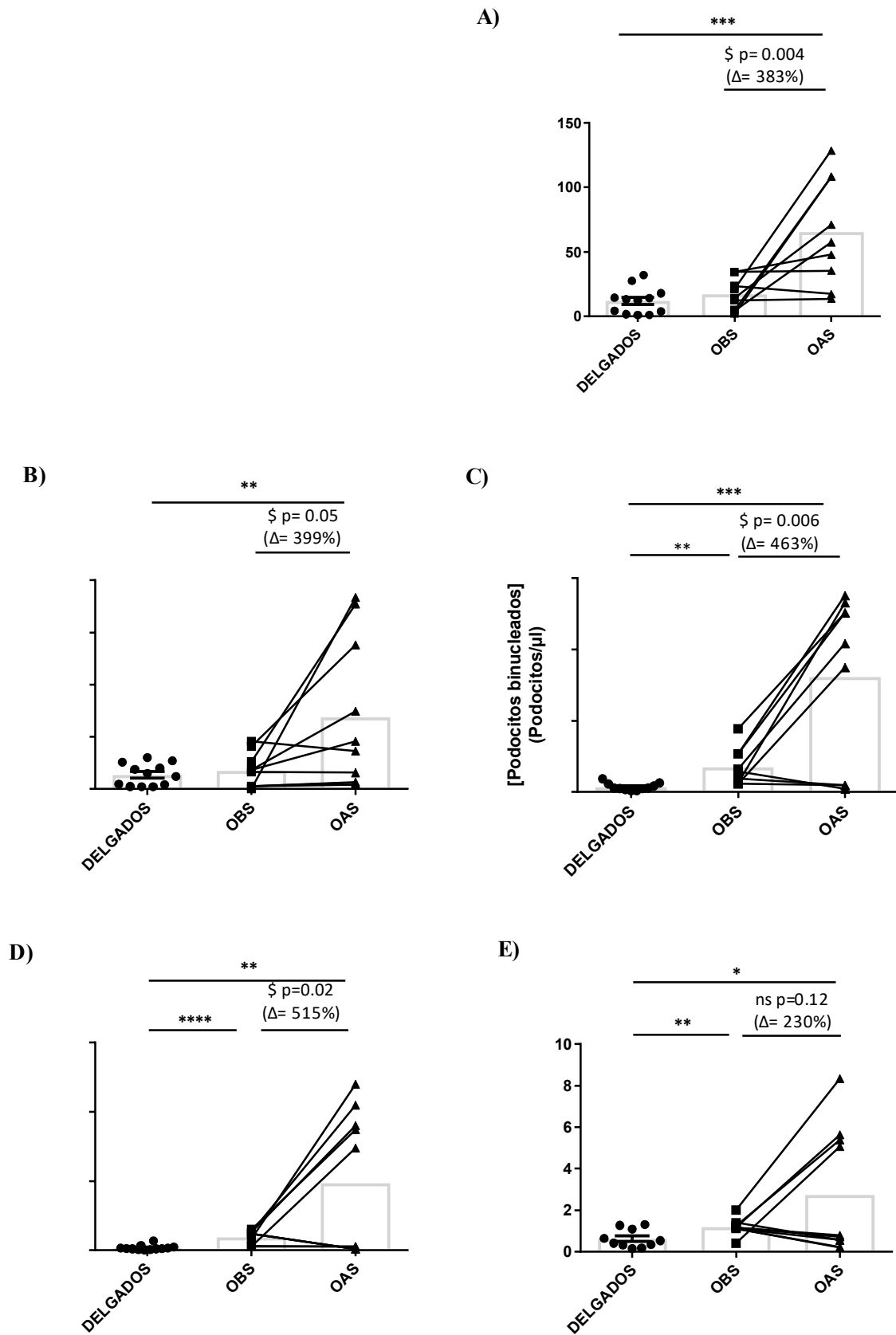


FIGURA 4

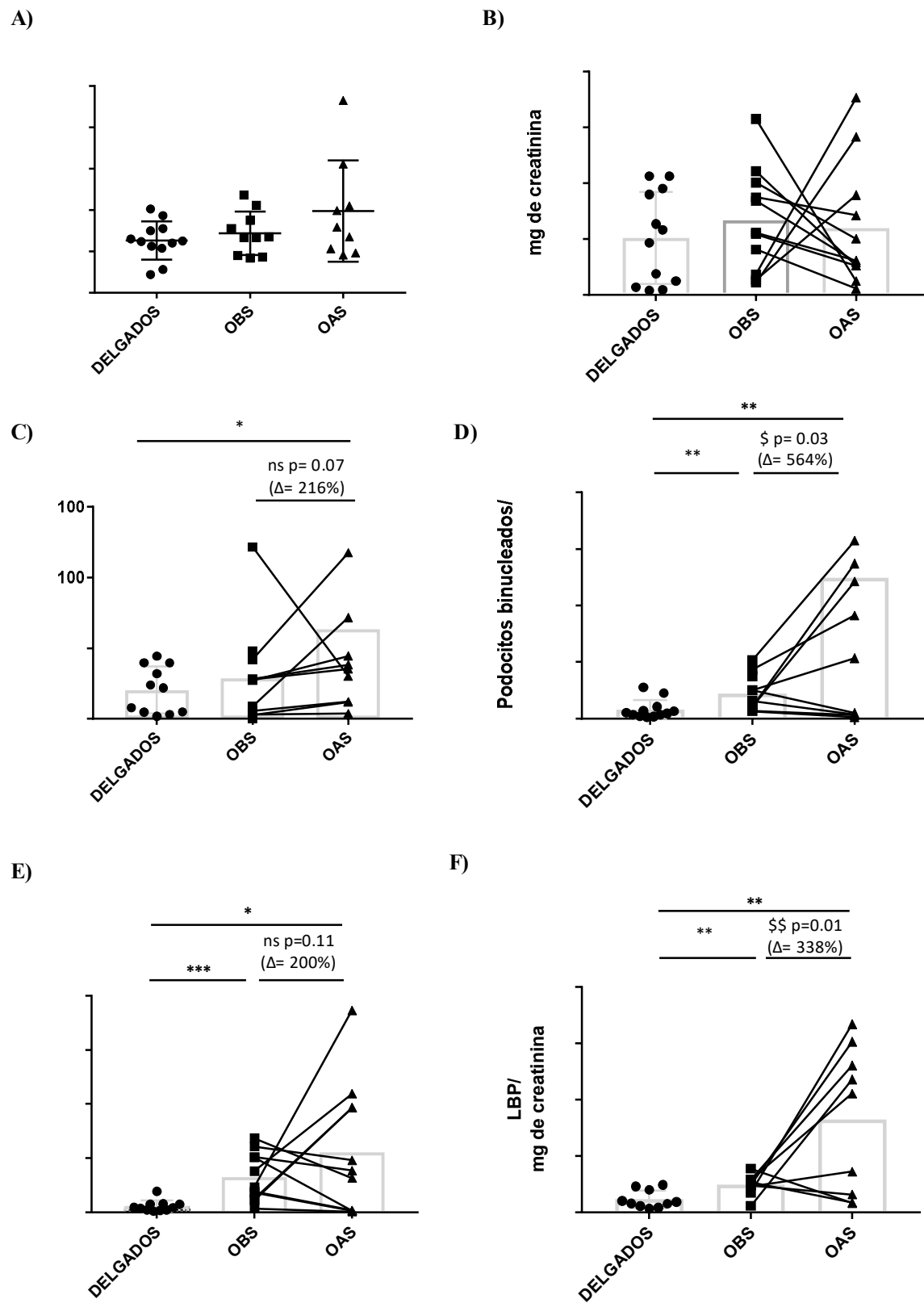


FIGURA 5

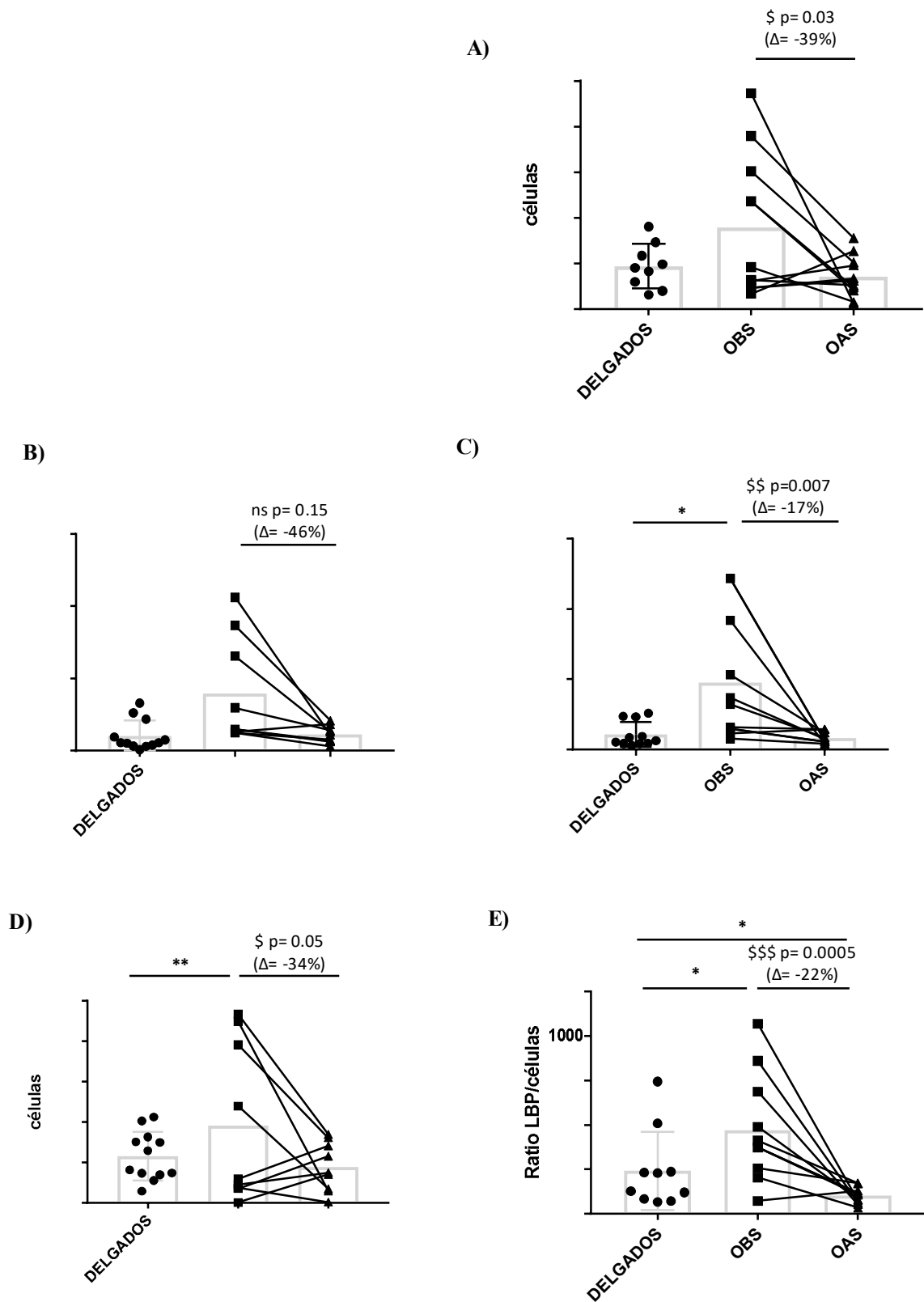


FIGURA 6



- ②① N.º solicitud: 202330600
②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.07.2023
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	Foot processes widening in renal disease uniformly accompany MÜHLDOERFER, J. et al. Bi-nucleation of podocytes. Nephrol Dial Transplant. Mayo 2018, Vol. 33, Nº 5. páginas 796-803. <DOI: 10.1093/ndt/gfx201> Resumen; página 796, columna derecha, segundo párrafo; página 797, columna izquierda, primer párrafo.	1-12
A	LINGFENG, Z. et al. Urinary podocyte markers in kidney diseases. Clinica Chimica Acta, Diciembre 2021, Vol. 523, páginas 315-324, ISSN 1873-3492 (electronic) <DOI: 10.1016/j.cca.2021.10.017> Página 316, columna izquierda, segundo párrafo; página 316, columna derecha, tabla 1; página 317, columna izquierda, cuarto párrafo; página 318, columna izquierda, último párrafo; página 319, columna izquierda, tabla 2; página 320, columna izquierda, último párrafo; página 320, columna derecha, tabla 3.	1-12
A	NAGATA, M. et al. Mitosis and the presence of binucleated cells among glomerular podocytes in diseased human kidneys. Nephron, 1995, Vol. 70, Nº 1, páginas 68-71, ISSN 0028-2766 (print) <DOI:10.1159/000188546> Página 68, columna derecha, último párrafo.	1-12
A	KOSTOVSKA I. et al. Urinary nephrin is earlier, more sensitive and specific marker of diabetic nephropathy than microalbuminuria. Journal of Medical Biochemistry. Enero 2020, Vol. 39, Nº 1. páginas 83-90, ISSN 1452-8258, <DOI: 10.2478/jomb-2019-0026> Resumen; página 84, columna izquierda, segundo párrafo; página 85, columna izquierda, cuarto párrafo; página 88, columna derecha, segundo párrafo; tablas I y II.	1-12
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 29.04.2024	Examinador S. González Peñalba	Página 1/3



21 N.º solicitud: 202330600
22 Fecha de presentación de la solicitud: 14.07.2023
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PEREIRA, S. V. <i>et al.</i> Increased urine podocyte-associated messenger RNAs in severe obesity are evidence of podocyte Injury. Obesity. Agosto 2015, Vol. 23, Nº 8, páginas 1643-1649, ISSN 1930-739X (electronic), <DOI:10.1002/oby.21156> Resumen; página 1644, columna izquierda, primer, segundo, tercer párrafo; página 1644, columna derecha, tercer párrafo; página 1647, columna izquierda, último párrafo- columna derecha, primer párrafo; página 1648, columna izquierda, segundo párrafo; página 1648, columna derecha, segundo párrafo.	1-12
A	WANG P. <i>et al.</i> Detection of urinary podocytes and nephrin as markers for children with glomerular diseases. Experimental Biology and Medicine. Febrero 2015, Vol. 240, Nº 2, páginas 169-174, ISSN 1535-3699 (electronic), < DOI:10.1177/1535370214548995> Resumen; página 170, columna izquierda, primer párrafo; página 171, columna izquierda, primer párrafo y página 173.	1-12
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 29.04.2024	Examinador S. González Peñalba	Página 2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/48 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

G01N33/493 (2006.01)

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

G01N

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

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