

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Título de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

MÉTODO PARA LA MONITORIZACIÓN, EL DIAGNÓSTICO Y/O EL PRONÓSTICO DE LESIÓN RENAL AGUDA EN FASE TEMPRANA

2 Datos del Solicitante / Titular

Nombre:	UNIVERSIDAD DE LOS ANDES	Dirección Electrónica:	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
Dirección:	San Carlos de Aporquindo 2200, Las Condes, Santiago 91003910, Chile	Domicilio/País de constitución:	CHILE - SANTIAGO - SANTIAGO DE CHILE

Identificación:

☐ CEDULA DE CIUDADANIA
☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☒ EMPRESA EXTRANJERA
☐ NIT
☐ PASAPORTE

Número: 90004803477-

3 Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación
1. UNIVERSIDAD DE LOS ANDES	EE	90004803477

4 Datos del Inventor

Nombre:	Carlos Ernesto IRARRAZABAL MUÑOZ	Dirección Electrónica:	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
Dirección:	Jorge González Bastias 3997, Macul, Santiago, 7830238, Chile	Domicilio/País de constitución:	CHILE - SANTIAGO - MACUL
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE ☒ No Aplica Número: -			
5	Inventor(es)		
Apellidos - Nombres		Domicilio	
1. IRARRAZABAL MUÑOZ Carlos Ernesto		CHILE	
6	Datos Inventor(es)		
País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1. CHILE	SANTIAGO	MACUL	Jorge González Bastias 3997, Macul, Santiago, 7830238, Chile
7	Datos del Representante Legal / Apoderado		
Nombre:	ALICIA LLOREDA RICAURTE	Dirección Electrónica:	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
Dirección:	Calle 72 No 5- 83	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.

Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE			
Número:		53215-	
Presentación de Poder			
Año de Radicación			
Número de Radicación			
8	Datos Solicitud: PCT / WO		
Número Solicitud:		PCT/IB2011/054187	Fecha Solicitud:
			22/09/2011
Número Publicacion:		WO 2013/041913	Fecha Publicacion:
			28/03/2013
9	Declaraciones de prioridad		☐ SI ☒ NO
	(33) País de origen	Codigo del país	(31) No. Solicitud
			(32) Fecha _
1			
2			
3			
10	Reivindicaciones		
Número reivindicaciones:		33	Pago Reivindicaciones:
			No
11	Reducción de tasas.		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
12	Documentos Anexos		
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☒ Dibujos y/o Figuras			

- ☒ Resumen
- ☐ Certificado Depósito Material Biológico
- ☐ Uso de Conocimiento tradicional
- ☐ Listado de secuencias
- ☐ Artes finales 12 x 12 cm
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☒ Otros Anexos

MÉTODO PARA LA MONITORIZACIÓN, EL DIAGNÓSTICO Y/O EL PRONÓSTICO DE LESIÓN RENAL AGUDA EN FASE TEMPRANA

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un método y un kit para la monitorización, el diagnóstico y/o el pronóstico de lesión renal aguda en fase temprana y la determinación del tratamiento en sujetos que padecen la misma.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El riñón es un órgano que sirve para múltiples funciones en el cuerpo, entre las que destacan la eliminación de sustancias de desecho corporales que se producen durante el metabolismo, y la devolución a la sangre de sustancias que son necesarias para el cuerpo, así como también la
15 regulación del volumen y la composición de los líquidos corporales. El equilibrio hidroelectrolítico del cuerpo se mantiene debido a la función renal (Guyton A., Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, décima edición. México DF, México: McGraw-Hill Interamericana).

20 Las enfermedades renales son una de las causas más importantes de fallecimiento en muchos países. Ya en 1994, más de 15 millones de personas presentaban enfermedades renales en los Estados Unidos, provocando un deterioro en la calidad de vida del paciente y su fallecimiento (Guyton A., Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, décima edición. México DF, México: McGraw-Hill Interamericana).

25 Las manifestaciones clínicas de la enfermedad renal pueden agruparse en síndromes bastante bien definidos. Algunos son específicos para las enfermedades glomerulares, y otros están presentes en enfermedades que afectan a cualquiera de las estructuras renales. Estas enfermedades se encuentran entre las causas de morbilidad grave y
30 fallecimiento en muchos países (Guyton A., Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, décima edición. México DF, México: McGraw-Hill Interamericana).

Las enfermedades renales graves pueden agruparse en dos categorías principales:

Patologías

5 La insuficiencia renal es un estado clínico en el que los riñones no pueden funcionar apropiadamente, reduciendo la tasa de filtración glomerular. Clínicamente, este defecto se divide en dos grupos: lesión renal aguda (LRA) e insuficiencia renal crónica (IRC) (Guyton A., Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, décima edición. México DF, México: McGraw-Hill Interamericana).

10

Insuficiencia renal

Lesión renal aguda

15 Entre sus síntomas están incluidos oliguria o anuria (disminución o ausencia de excreción urinaria), con azoemia, que corresponde a la acumulación de productos nitrogenados en la sangre. Los productos de desecho metabólicos también se acumulan debido a la retención hídrica, que determina una sobrecarga de líquidos y sales, que da como resultado edema e hipertensión.

20 Una de las mayores amenazas de los síntomas es la retención de potasio (hiperpotasemia), por encima de 8 mEq/l, que podría ser fatal. Los riñones no excretan una cantidad normal de iones de hidrógeno, dando como resultado una manifestación de acidosis metabólica.

25 Si la enfermedad continúa sin resolución, puede alcanzar una anuria completa, que puede conducir al fallecimiento en el plazo de 8 a 14 días (Guyton A., Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, décima edición. México DF, México: McGraw-Hill Interamericana).

 La LRA se divide en 3 categorías principales: prerrenal, intrarrenal y postrenal.

30

Tabla 1. Causas de lesión renal aguda (Guyton A., Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, décima edición. México DF, México: McGraw-Hill Interamericana).

Algunas causas de lesión renal aguda prerrenal	
Hipovolemia intravascular	Hemorragia (traumática, quirúrgica, puerperal, digestiva)
	Diarrea
	Quemaduras
Trastornos hemodinámicos renales primarios	Estenosis de la arteria renal
	Embolia o trombosis de la vena o arteria renal
	Bloqueo excesivo de la síntesis de prostaglandinas (aspirina)
Vasodilatación periférica e hipotensión resultante	Choque anafiláctico, septicemia, infecciones graves
	Anestesia
Algunas causas de lesión renal aguda intrarrenal	
Lesiones en pequeños vasos, glomérulos o ambos	Vasculitis (poliarteritis nudosa)
	Émbolos de colesterol
	Hipertensión maligna
	Glomerulonefritis aguda
Lesión epitelial tubular (necrosis tubular)	Necrosis tubular aguda isquémica
	Necrosis tubular aguda por toxinas (metales pesados, etilenglicol, insecticidas, setas venenosas, tetracloruro de carbono)
Lesión del intersticio renal	Pielonefritis aguda
	Nefritis intersticial alérgica aguda
Obstrucción bilateral de los uréteres o la pelvis renal	Cálculos renales
	Coágulos hemáticos
Obstrucción de vejiga	

Obstrucción de los uréteres.	
------------------------------	--

En países industrializados, LRA es un estado patológico adquirido principalmente en hospitales y originado por varios factores, tales como septicemia, intervenciones quirúrgicas, particularmente cirugías cardíacas, isquemia, administración de nefrotoxinas, por tanto, existe la necesidad de técnicas de diagnóstico y tratamientos modernos para prevenir y disminuir el impacto de LRA (Vukusich A., Alvear F., Villanueva P., Gonzalez C, Olivari F., Alvarado N., Zehnder C. 2004, Rev. Med. Chile, 132:1355-1361).

La mayor parte de los pacientes que desarrollan un episodio de LRA recuperan niveles aceptables de función renal, de modo que no dependen de diálisis, aunque del 10 al 20% de estos pacientes finalmente necesitan diálisis permanentemente (Fauci, A. 2009, Harrison, Principles of intern medicine. México, F.D. Interamericana - McGraw Hill). Entre el 5 y el 7% de los pacientes hospitalizados tienen complicaciones relacionadas con un episodio de LRA, provocando el 30% de los costes en la UCI (Fauci, A. 2009, Harrison, Principles of intern medicine. México, F.D. Interamericana - McGraw Hill). LRA es un grave problema, por tanto, se dedica una gran cantidad de esfuerzo al desarrollo de una intervención temprana de la patología, especialmente en pacientes de alto riesgo, tales como pacientes en la UCI (Vukusich A., Alvear F., Villanueva P., Gonzalez C, Olivari F., Alvarado N., Zehnder C. 2004, Rev. Med. Chile, 132:1355-1361; Schrier R. 2010, Nat. Rev. Nephrol, 6:56-59).

Insuficiencia renal crónica

Tal como se mencionó anteriormente, la insuficiencia renal crónica es una consecuencia de la pérdida irreversible de un gran número de nefronas funcionales.

La eficiencia de los riñones nos permite mantener concentraciones en sangre relativamente normales de la mayor parte de electrolitos y un volumen apropiado de los líquidos corporales, mientras que el número de nefronas funcionales permanece por encima del 20 al 30% de lo normal. No se presentan síntomas clínicos graves por encima de esta cifra (Guyton A.,

Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, décima edición. México DF, México: McGraw-Hill Inter americana).

Entre las causas más importantes de insuficiencia renal crónica están las descritas en la tabla 2.

5

Tabla 2. Causas de insuficiencia renal crónica (Guyton A., Hall J.E. 2001, Medical Physiology Treaty, décima edición. México DF, México: McGraw-Hill Interamericana).

Trastornos metabólicos	Diabetes mellitus
	Amiloidosis
Trastornos vasculares renales	Aterosclerosis
	Nefrosclerosis-hipertensión
Trastornos inmunitarios	Glomerulonefritis
	Poliarteritis nudosa
	Lupus eritematoso
Infecciones	Pielonefritis
	Tuberculosis
Trastornos tubulares primarios	Nefrotoxinas (analgésicos, metales pesados)
Obstrucción de las vías urinarias	Cálculos renales
	Hipertrofia prostática
	Estenosis uretral
Trastornos congénitos	Enfermedad poliquística
	Ausencia congénita de tejido renal (hipoplasia renal)

10

Enfermedad renal en fase terminal (ERFT)

En muchos casos, la lesión inicial del riñón conduce al deterioro progresivo de la función renal, y una pérdida continuada de nefronas, hasta el punto de que el paciente debe entrar en un programa de diálisis o un trasplante de riñón para sobrevivir. Este estado se denomina insuficiencia renal crónica (Kumar V., Cotran R. 2000, Structural and Functional Pathology of Robbins, sexta edición, Madrid, España: Elsevier).

15

Tabla 3. Causas más frecuentes de ERFT (Kumar V., Cotran R. 2000, Structural and Functional Pathology of Robbins, sexta edición, Madrid, España: Elsevier).

5

Causa	Porcentaje de pacientes totales con
	ERFT (%)
Diabetes mellitus	41
Hipertensión	28
Glomerulonefritis	11
Enfermedad de riñón poliquístico	3
Otra / desconocida	18

Trasplante de riñón

El trasplante de riñón es el tratamiento más eficaz para la ERFT. El éxito del trasplante depende de muchos factores tales como el tipo de donante. El donante del que procede el trasplante de riñón puede o bien haber fallecido o bien estar vivo. Todos los órganos trasplantados se ven sometidos a una lesión aguda debida a un proceso de isquemia y reperfusión asociado con el trasplante.

El trasplante de donante vivo es una excelente opción terapéutica para el tratamiento de insuficiencia renal crónica en fase terminal, especialmente en pacientes jóvenes. Permite seguir un protocolo previo al trasplante definido para ayudar a la mejor supervivencia del órgano, junto con un pequeño tiempo de isquemia (menos de 30 minutos). La supervivencia se vuelve mayor de 10 años, y superior en del 17 al 20% en comparación con trasplantes con órganos de donantes cadáver.

En el caso de trasplante de donante cadáver, el paciente entra en una lista de espera y se realiza la selección con respecto al grado de compatibilidad de ABO y HLA. Entre los criterios de selección están la edad, la similitud entre el índice de masa corporal de donante y receptor, si

corresponde al primer trasplante, y si el trasplante es de un riñón o ambos. En este caso, el tiempo de isquemia del órgano podría aumentar en varias horas (incluso 1 ó 2 días), lo que aumenta el deterioro del órgano trasplantado. También existen complicaciones adicionales, como para

pacientes en diálisis crónicos.

El paciente con trasplante renal requiere una monitorización estrecha, inicialmente en la unidad de cuidados intensivos (UCI) o la unidad de trasplantes y más tarde, paciente hospitalizado o como ambulatorio. Pueden producirse varias complicaciones quirúrgicas o médicas durante la monitorización. Aunque algunas complicaciones son prematuras y podrían tratarse a la vez que están todavía guardando cama en la UCI o la unidad de trasplantes, esta monitorización debe ampliarse a la totalidad de la vida completa del paciente, ya que hay complicaciones que pueden surgir incluso después de un largo periodo de tiempo tras recibir el trasplante (complicaciones tardías). Durante la función de injerto, es necesario administrar terapia inmunosupresora para aumentar la supervivencia del órgano trasplantado, la supervivencia del paciente, y para mejorar su calidad de vida. Este tratamiento se ajusta al estado clínico y serológico de cada paciente. Junto con inmunosupresores, deben tenerse en cuenta otros aspectos dentro de la monitorización a largo plazo del trasplante renal, que incluyen animar al paciente a seguir un estilo de vida saludable, la monitorización de la proteinuria y la creatinina en orina de 24 horas, la administración de tratamiento para hiperlipidemia, el control de la tensión arterial, la posible aparición de diabetes *de novo*, y en el caso de disfunción de injerto, la posible aparición de insuficiencia renal crónica.

Los pacientes con trasplante renal son un buen modelo de LRA en seres humanos. Estos pacientes tienen la ventaja de que no hay otras patologías que puedan alterar los biomarcadores estudiados. Sin embargo, tienen la desventaja de que están bajo farmacología inmunosupresora.

Diagnóstico de lesión renal aguda (LRA)

La lesión renal aguda (LRA) puede clasificarse en diferentes niveles dependiendo de la fase correspondiente al deterioro de la función renal.

LRA se clasifica dependiendo de una variedad de parámetros, los más comunes son la determinación de la creatinina en suero (CRS) y la

diuresis (D), que aparecen de forma tardía en el desarrollo de la enfermedad, y como tal, no permiten el diagnóstico de LRA en fase tempranas.

5 **Creatinina**

La creatinina es un subproducto metabólico formado en el tejido muscular por la degradación de fosfocreatina, que se elimina del cuerpo a través de filtración a nivel glomerular. La tasa total de producción de creatinina dependerá de la masa muscular, la actividad muscular, el sexo, la edad y el consumo total de proteínas. Estas variables también afectan a los niveles en plasma de creatinina. A pesar de estas limitaciones, el método más usado para el diagnóstico de LRA es cuando los niveles en suero de creatinina son superiores a 0,6-1,2 mg/dl.

15 **Aclaramiento de creatinina**

El aclaramiento de creatinina es la cantidad de creatinina que se elimina del flujo sanguíneo en un periodo de tiempo. Se determina este parámetro para estimar la filtración glomerular. Los niveles habituales del aclaramiento de creatinina son de entre 125-150 ml/min y ligeramente menores en mujeres.

Oliguria

La oliguria se define como una disminución en la producción de orina, con un valor inferior a 400 ml al día, considerando 400 ml como la cantidad mínima de orina que debe liberarse en un estado metabólico normal para eliminar los solutos producidos diariamente.

Uremia

La uremia corresponde a niveles elevados de urea en sangre. La determinación de este parámetro es a través de la determinación del nitrógeno ureico en sangre (BUN), que en valores normales es de entre 8 y 18 mg/dl.

35 **Clasificación de riesgo, lesión, insuficiencia, pérdida y enfermedad renal en fase terminal (RIFLE)**

RIFLE es una herramienta propuesta para clasificar diferentes fases de LRA: *Risk* (riesgo), *Injury* (lesión), *Failure* (insuficiencia), *Loss* (pérdida), *End-stage kidney disease* (enfermedad renal en fase terminal). Se basa en los niveles de creatinina en suero (CRS) y diuresis (D) del paciente. (Carrillo R., Castro J. "009. RIFLE scale. Journal of Mexican association of critic medicine and intensive therapy, 23(4):241-244). Tal como se usa en la presente invención, LRA 1, LRA 2 y LRA 3, corresponden a las fases R, I y L de RIFLE respectivamente.

Lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos (NGAL)

Usando genómica y proteómica, se ha identificado una serie de moléculas como posibles marcadores de lesión renal aguda, incluyendo NGAL, cistatina-3, KIM-1, IL-1beta e IL-18.

NGAL se expresa habitualmente a bajas concentraciones, y esta aumentado significativamente para daño epitelial (Schmidt-Ott K.M., Mori K., Kalandadze A., Li J.Y., Paragas N., Nicholas T., Devarajan P., Barasch J. 2006, Curr Opin Nephrol Hypertens, 15:442-449; Cowland J.B., Borregaard N. 1997, Genomics, 45:17-23). NGAL es una pequeña proteína que pertenece a la familia de las lipocalinas. La NGAL humana es una cadena polipeptídica sencilla, con puentes disulfuro, con 178 residuos de aminoácido, con una masa de 23 KDa, y su forma dimérica de 46 KDa (Kjeldsen L., Johnsen A.H., Sengelov H., Borregaard N. 1993, J Biol Chem, 268:10425-10432.) Esta proteína se expresa en neutrófilos de determinados epitelios, incluyendo el epitelio de túbulos renales proximales. NGAL es una proteína secretada y se caracteriza por su capacidad para unirse a moléculas pequeñas e hidrófobas en su forma de cavidad conservada estructuralmente, a través de láminas β plegadas para formar complejos macromoleculares (Uttenthal L.O. 2005 Clin Lab, 29:39-41).

Tal como ya se mencionó, es muy difícil detectar daño renal en fase temprana. NGAL ha superado parcialmente los obstáculos generales en esta cuestión, y ha demostrado ser útil en el diagnóstico de lesión renal aguda, mostrando que es posible realizar este diagnóstico en fase temprana (Zappitelli M., Washburn K.K., Arikan A.A., Loftis L., Ma Q., Devarajan P., Parikh C.R., Goldstein S.L. 2007 Crit Care, 11: R84.).

5 Numerosos estudios muestran que NGAL presenta un aumento significativo en pacientes con lesión renal aguda, pero no en los controles correspondientes, produciéndose este aumento en el plazo de las primeras 24 a 48 horas, y antes del aumento de la creatinina. Este marcador se usa tanto en plasma como en orina, pero todavía requiere una evaluación completa en diferentes áreas clínicas (Mishra J., Dent C, Tarabishi R., Mitsnefes M.M., Ma Q., Kelly C, Ruff S.M., Zahedi K., Shao M., Bean J., Mori K., Barasch J., Devarajan P. 2005, *Lancet*, 365:1231-1238; Devarajan P. 2007, *Contrib Nephrol*, 156:203-212).

10 También se ha mostrado un aumento en este marcador en orina tras cirugías tales como derivación cardiopulmonar en adultos (Wagener G., Jan M., Kim M., Mori K., Barasch J.M., Sladen R.N., Lee H.T. 2006, *Anesthesiology*, 105:485-491), intervenciones coronarias percutáneas (Bachorzewska-Gajewska H., Malyszko J., Sitniewska E., Malyszko J.S., Dobrzycki S. 2006, *Am J Nephrol*, 26:287-292), angiografía coronaria (Bachorzewska-Gajewska H., Malyszko J., Sitniewska E., Malyszko J.S., Dobrzycki S. 2007, *Nephrol Dial Transplant*, 22:295-296.), y también procedimientos cardíacos en niños (derivación coronaria en niños) (Mishra J., Dent C, Tarabishi R., Mitsnefes M.M., Ma Q., Kelly C, Ruff S.M., Zahedi K., Shao M., Bean J., Mori K., Barasch J., Devarajan P. 2005, *Lancet*, 365:1231-1238).

20 La limitación de la medición de NGAL en orina y plasma como marcador de LRA, con respecto a la fase actual de las investigaciones, es que NGAL todavía está evaluándose como marcador renal adecuado. Adicionalmente, se declara que si NGAL es exclusivamente de origen renal, este biomarcador sería uno de los mejores marcadores de daño renal de células de túbulo que podría concebirse. En orina, NGAL muestra un aumento de 10.000 veces la concentración en el daño renal más grave por encima de los niveles normales. En plasma, el aumento máximo es de aproximadamente 100 veces. Esto hace que NGAL sea potencialmente un marcador muy sensible de diferentes grados de lesión renal. Sin embargo, el extremo inferior de este amplio intervalo dinámico está ocupado por los aumentos de NGAL debidos a fuentes extrarrenales en enfermedades tales como cáncer y otras (www.clionline.com). Este enfoque innovador trata de abordar esta cuestión por medio del análisis de NGAL en exosomas

procedentes del riñón, particularmente, exosomas específicos de estructuras renales específicas para establecer el diagnóstico temprano y no invasivo de LRA.

5 **Acuaporina 1 (AQP1)**

La acuaporina 1 (AQP1) es una proteína integral de membrana y fue la primera de su clase que se caracterizó estructural y funcionalmente a partir de glóbulos rojos humanos. La proteína tiene una estructura tetramérica, y cada una de sus subunidades tiene funcionalidad por sí misma (Preston G.M., Jung J.S., Guggino W.B., Agre P. 1993, J Biol Chem, 268:17-20.). Tiene un peso de 28 KDa (Friedman M. 2008, Principles and models of biological transport, segunda edición, Nueva York, EE.UU.: Springer), y su patrón de expresión depende de la edad y el tejido que esté examinándose (riñón, pulmón, cerebro y ojos) (Bondy C., Chin E., Smith B.L., Preston G.M., Agre P. 1993, Proc Natl Acad Sci USA, 90:4500-4504).

Este canal se expresa fuertemente en el túbulo proximal renal, en el epitelio del asa de Henle en su parte descendente y en el endotelio de los vasos rectos. La alta concentración de esta proteína en el asa descendente de Henle (el 25% de la proteína total), sugiere un papel esencial en el mecanismo de concentración renal. Esto se ha demostrado en estudios que han generado ratones transgénicos en los que se ha desactivado la expresión para el gen de AQP1, dando como resultado la disminución de la permeabilidad al agua en el túbulo proximal, de modo que no pueden concentrar su orina (Ma T., Yang B., Gillespie A., Carlson E.J., Epstein C.J., Verkman A.S. 1998, J Biol Chem, 273:4296-4299). El fenotipo anómalo asociado con la delección de AQP1 plantea la posibilidad de que otras acuaporinas de mamífero tengan una importante función fisiológica, puesto que en un informe de 3 pacientes sin AQP1 aparentemente normales, no se incluyó el análisis de la ingesta de líquidos o la respuesta fisiológica a cierto estrés como deshidratación (Preston G.M., Smith B.L., Zeidel M.L., Moulds J J., Agre P. 1994, Science, 265:1585-1587).

35 **Acuaporina 2 (AQP2)**

La acuaporina 2 (AQP2) es una proteína integral de membrana que sirve como canal para el paso de agua. Este canal está regulado por la

vasopresina, y está ubicado en el túbulo conector y el conducto colector del riñón, en su región apical (Fushimi K., Uchida S., Hara Y., Hirata Y., Marumo F., Sasaki S. 1993, Nature, 361:549-552).

Se han llevado a cabo estudios con ratones transgénicos debido a la importancia de esta proteína. Se han modificado ratones para que expresen selectivamente esta acuaporina en el túbulo conector y no en el conducto colector. Además, se han desarrollado ratones completamente deficientes en esta proteína. Se ha observado que los ratones deficientes mueren de manera posnatal (5-12 días), mientras que ratones, en los que sólo se bloqueó la expresión en el conducto colector, crecen hasta la edad adulta, mostrando una disminución del peso corporal disminuido, 10 veces de aumento en la producción de orina y una disminución de la osmolaridad de la orina. Cuando se privan de agua durante 3 horas, no hay un cambio significativo en la osmolaridad de la orina, demostrando que no existen mecanismos compensatorios (Rojek A., Fichtbauer E.M., Kwon T.H., Frøkjaer J., Nielsen S. 2006, Proc Natl Acad Sci USA, 103:6037-6042).

En ausencia de vasopresina, la hipertonicidad induce una acumulación de AQP2 en la membrana plasmática en el plazo de 10 minutos. Esto se produce en las principales células del conducto colector de riñón de rata *in situ*, y también en varias líneas epiteliales de riñón, demostrando su importancia en casos de estrés para el riñón (Hasler U., Nunes P., Bouley R., Lu H.A., Matsuzaki T., Brown D. 2008, J Biol Chem, 283:26643-26661).

También se sabe que existen muchas mutaciones recesivas del gen que expresa la proteína (Leduc-Nadeau A., Lussier Y., Arthus M.F., Lonergan M., Martinez-Aguayo A., Riveira-Munoz E., Devuyst O., Bissonnette P., Bichet DG. 2010, J Physiol, 588:2205-2218), y también mutación dominante (Mulders S.M., Bichet D.G., Rijss J.P., Kamsteeg E.J., Arthus M.F., Lonergan M., Fujiwara M., Morgan K., Leijendekker R., Van der Sluijs P., Van Os C.H., Deen P.M. 1998, J Clin Invest, 102:57-66.) que pueden producir diabetes insípida nefrótica.

Acuaporina 3 (AQP3)

La acuaporina 3 (AQP3) es una proteína integral de membrana, con un peso de 30 kDa (Wakayama Y., Jimi T., Inoue M., Kojima H., Shibuya S.,

Murahashi M., Hara H., Oniki H. 2002, *Histochem J*, 34:331-337) y se expresa en la membrana basolateral de células epiteliales del conducto colector renal. A diferencia de otras acuaporinas, esta proteína también puede transportar glicerol (Ma T., Frigeri A., Hasegawa H., Verkman A.S. 1994, *J Biol Chem*, 269:21845-21849.).

En experimentos en los que se desactiva la expresión para el gen de AQP3 en ratones, se observa poliuria, disminución de la expresión de AQP2, particularmente en la corteza renal y disminución de la osmolaridad de la orina. La responsabilidad de AQP3 en estos cambios se demostró más tarde desactivando la expresión de otras acuaporinas (Ma T., Song Y., Yang B., Gillespie A., Carlson E.J., Epstein C.J., Verkman A.S. 2000, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:4386-4391).

Se han identificado otras proteínas que se expresan preferiblemente y de manera diferencial en estructuras específicas del riñón, tales como por ejemplo, NKCCC2 en el asa de Henle, y NHE-3 y NaPiII en el túbulo proximal.

Exosomas de orina

El grupo del Dr. Mark Knepper ha desarrollado estudios proteómicos en orina de seres humanos sanos. Estos estudios han analizado las fracciones de orina celular y exosómica, obtenidas mediante centrifugación diferencial (Knepper M.A., Pisitkun T., Shen R.F. 2004, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:13368-13373). La fracción exosómica ha recibido un particular interés porque se cree que es una fuente rica de proteínas representativas del epitelio renal.

Los exosomas se producen a partir de la endocitosis de proteínas de membrana apical. Después de esto, el endosoma se fusiona con el cuerpo multivesicular (CMV). Por consiguiente, las proteínas de membrana apical se segregan en la membrana externa del CMV y se internalizan mediante invaginación de la membrana. Finalmente, la membrana externa del CMV se fusiona con la membrana apical, liberando sus vesículas internas, denominadas exosomas, en el espacio urinario (Knepper M.A., Pisitkun T., Shen R.F. 2004, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:13368-13373). Las proteínas identificadas actualmente en exosomas de orina corresponden a proteínas de la membrana plasmática (NKCCC2, CD24, etc..) proteínas citoplasmáticas

(GAPDH, etc.) y proteínas nucleares (AFT3 y WT-1) (Zhou H., Cheruvanky A., Hu X., Matsumoto T., Hiramatsu N., Cho M.E., Berger A., Leelahavanichkul A., Doi K., Chawla L.S., Illei G.G., Kopp J.B., Balow J.E., Austin H.A. 3rd, Yuen P.S., Star R.A. 2008, Kidney Int, 74:613-621).

5

Estado de la técnica

El documento US2010203529 describe exosomas que pueden usarse para detectar biomarcadores en el diagnóstico, por ejemplo de la fase o progresión de una enfermedad, que describe también qué biomarcadores de

10

célula de origen pueden usarse para determinar adicionalmente regímenes de tratamiento para enfermedades y establecer la eficacia del tratamiento.

El documento EP2191276 describe un método de diagnóstico prenatal mediante el aislamiento de exosomas de un líquido, en el que los exosomas se identifican mediante un biomarcador específico, en particular

15

CD24.

El documento GB2463401 describe un método para caracterizar el fenotipo, diagnosticar una enfermedad determinando una biofirma de un exosoma en una muestra del sujeto. Los marcadores mencionados comprenden perfiles de miARN, o antígenos incluyendo CD63, CD9, CD81, B7H3, EpCam, PSCA, TNFR, MFG-E8, Rab, SETAP, PCMA o 5T4. Además, el método menciona que puede usarse para determinar la célula de origen de los exosomas para producir perfiles de estados fisiológicos o determinar fenotipos.

20

El documento WO2009115561 describe un polipéptido para la identificación de vesículas de membrana o exosomas. Además, la invención describe preparaciones inmunogénicas para prevenir y/o tratar una infección debida a un patógeno o un antígeno tumoral.

25

El documento KR20070058441 describe métodos y composiciones para su uso en reacciones de inmunosupresión. Las composiciones comprenden exosomas con actividad inmunosupresora, en las que los exosomas pueden derivarse de diferentes tipos celulares, principalmente del sistema inmunitario. Además, los exosomas pueden exponerse a moléculas para potenciar la actividad inmunosupresora. Los exosomas se usan en el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con el mal funcionamiento del sistema inmunitario.

30

35

El documento US 2007254351 describe un método para el aislamiento de virus de la hepatitis C, que comprende la separación de exosomas de plasma sanguíneo de un individuo infectado con el virus.

El documento AU2004203482 describe vesículas de membrana que comprenden moléculas (exosomas), en las que las moléculas proceden del complejo mayor de histocompatibilidad, y en las que los exosomas se usan como inmunógeno o para fines de diagnóstico.

El documento US 2004197314 describe composiciones y métodos para expresar un polipéptido en la membrana de una vesícula (exosoma), centrándose principalmente en la producción sintética de exosomas.

El documento CA2453198 describe exosomas que pueden usarse en la identificación y cuantificación de factores inmunosupresores en líquidos biológicos de pacientes con cáncer. Estos exosomas pueden usarse solos o en combinación con otros ensayos inmunológicos como indicador pronóstico para el paciente con cáncer.

El documento EP1523990 describe exosomas derivados de células tumorales. Estos exosomas tienen antígenos específicos de tumor y moléculas para la estimulación de linfocitos.

Zhou *et al* (2006) describen exosomas de orina que portan marcadores de disfunción renal y lesión estructural de un modelo de lesión renal aguda en animales. Los exosomas se obtuvieron mediante centrifugación, y se hallaron marcadores de lesión renal. (Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. Zhou H., Pititkun T., Apont A., Yuen P. S., Hoffert J.D., Yasuda H., Hu. X, Chawla L., Shen R-F., Knepper M.A., Star R., 2006, Kidney Int. 70(10):1847-1857).

Zhou *et al* (2008) describen exosomas de orina procedentes de segmentos de nefrona que son ricos en biomarcadores de lesión renal. Describen el aislamiento de estos exosomas mediante centrifugación diferencial, y además la detección de factores de transcripción mediante inmunotransferencia de tipo Western. Hallaron que estos marcadores eran detectables en los exosomas pero no en la orina completa en sujetos con una enfermedad renal, pero no se hallaron los marcadores en individuos sanos normales. (Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease. Zhou H. Cheruvanky A., Hu X., Matsumoto T.,

Hiramatsu N., Cho M.E., Berger A., Leelahavanichkul A., Doi K., Chawla L.S., Illei G.G., Kopp J.B., Balow J.E., Austin H.A. 3rd, Yuen P.S., Star R.A. 2008, *Kidney Int.* 74:613-621).

Devarajan (2007) propone un panel de marcadores de lesión renal aguda (LRA) para la detección temprana de lesión, así como la predicción del desenlace de la lesión renal en un paciente. (Proteomics for biomarker discovery in acute kidney injury. Devarajan P., Williams L.M. 2007, *Semin. Nephrol.* 27(6):637-651).

Lock (2010) revisa marcadores renales que pueden usarse como indicadores de daño renal, centrándose en el uso de tecnología de microalineamientos para detectar genes que están regulados por incremento en casos de lesión renal o del riñón. (Sensitive and early markers of renal injury: where are we and what is the way forward? Lock E. 2010, *Toxicological Sciences* 1(116):1 -4).

Alvarez *et al* (2010) describieron en un congreso que NGAL podría usarse como marcador de insuficiencia renal y además, también podría usarse como factor pronóstico de recuperación tras trasplante de riñón. (Pilot study for evaluating urinary exosomal fraction as kidney dysfunction biomarker in renal transplant. Alvarez S., Suazo C., Boltansky A., Urzu M., Carvajal D., Innocenti G., Vukusich A., Hurtado M., Campos D., Yen C., Villanueva S., Flores M., Marquez J., Rogello A., Irarrazabal C.E. 2010, VII Congreso Latinoamericano de lesión renal aguda: 29. Coquimbo-Chile).

Boltansky *et al* (2010) describieron NGAL como posible indicador de biomarcador para factor pronóstico de recuperación de órganos en casos de trasplante de riñón (NGAL in urinary exosomes as a source of kidney dysfunction biomarker in renal transplantation. Boltansky A., Alvarez S., Vukusich A., Hurtado M., Ursu M., Innocenti G., Carvajal D., Suazo C., Villanueva S., Carreno J., Altuzarra R., Yen C, Tapia D., Irarrazabal C.E. 2010, *Renal Semana*, Denver, CO, *J Am Soc Nephrol* 21:959).

Los documentos encontrados en la técnica muestran que se han centrado los esfuerzos recientes en la descripción y caracterización de factores de transcripción y moléculas de biomarcador de exomas específicos de diferentes tipos de células, entre los que destacan las células renales que definen la lesión renal. También se aborda una serie de métodos que describen el aislamiento de exomas, junto con

biomarcadores y procedimientos de diagnóstico. Dichos documentos describen una investigación similar a la presente invención, lo que sugiere el uso de exosomas como marcador de patología (documentos US2010203529, GB2463401, Zhou H. *et al* 2006, Devarajan 2007, y Lock 2010) y en particular, lesión renal aguda (Zhou, H. *et al* 2008, Zhou H. *et al* 2006, Devarajan 2007 y Lock 2010), especificando el uso de marcadores particulares, tales como por ejemplo KIM-1, NGAL, IL-8 y cistatina. No obstante, la presente invención muestra diferencias relevantes con la técnica anterior. En particular, Zhou, H. *et al* 2008 no describen el uso de anticuerpos, tales como anticuerpos contra acuaporina-1, acuaporina-2, acuaporina-3 (AQPs), NKCC2, NHE-3 y NaPiII, que permitirían la inmunopurificación de exosomas que contienen estas moléculas (AQPs, NKCC2, NHE-3, NaPiII) permitiendo una identificación y un diagnóstico mejores y más específicos de lesión renal. Zhou H. *et al* 2006 no describen inmunoprecipitaciones específicas ni algunos de los marcadores exosómicos usados en la presente invención. Devarajan 2007 no describe el uso de inmunopurificación específica de áreas renales específicas basándose en el uso de anticuerpos anti-AQP, anti-NKCC2, anti-NHE-3 y/o anti-NaPiII. Lock 2010 no describe inmunopurificación específica.

Alvarez *et al* (2010) y Boltansky *et al* (2010) proponen el uso de NGAL como indicador de lesión renal y como factor pronóstico de la recuperación del órgano en casos de trasplante de riñón, pero ninguno de ellos describió la fase de inmunopurificación de exosomas con el fin de tener una determinación más exacta de un marcador de lesión renal, en oposición a la presente invención.

Por tanto, la técnica anterior no describe suficientes antecedentes para afectar a la novedad o la actividad inventiva de la presente invención. La presente invención se basa en la inmunopurificación de exosomas que contienen AQP-1, AQP-2, AQP-3 (AQP), NKCC2, NHE-3 y/o NaPiII.

Además, los ejemplos de aplicación muestran que el procedimiento es exacto en la determinación de lesión renal en un paciente.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para la monitorización, el diagnóstico y/o el pronóstico de lesión renal aguda en fase temprana y la

determinación del tratamiento en sujetos que padecen la misma, comprendiendo el método las etapas de a) proporcionar una muestra de orina; b) enriquecer la muestra de orina en exosomas presentes en la muestra de orina usando al menos una etapa de inmunopurificación; c) detectar un marcador de lesión renal aguda (LRA) en el exosoma.

La invención comprende además un kit de diagnóstico para determinar la presencia y/o el nivel de un marcador de lesión renal específico, la determinación sencilla y temprana de la aparición de LRA en un sujeto, el kit que comprende medios para enriquecer la muestra de orina en exosomas, usando al menos una etapa de inmunopurificación, y medios para detectar un marcador de lesión renal predeterminado de un estado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para la monitorización, el diagnóstico y/o el pronóstico de lesión renal aguda en fase temprana y la determinación del tratamiento en sujetos que padecen la misma, comprendiendo el método las etapas de a) proporcionar una muestra de orina; b) enriquecer la muestra de orina en exosomas presentes en la muestra de orina usando al menos una etapa de inmunopurificación; c) detectar un marcador de lesión renal aguda (LRA) en el exosoma.

En una realización, la muestra de orina se obtiene de la primera micción de la mañana para pacientes cateterizados, y de la segunda micción para otros pacientes y se mantiene a -80°C hasta que se analiza.

La presente invención considera como medios para enriquecer la muestra de orina en exosomas al menos una etapa de inmunopurificación. En particular, el uso de anticuerpos dirigidos contra el dominio intracelular, extracelular o cualquier dominio de proteínas particulares que se expresan preferiblemente y de manera diferencial en estructuras específicas del riñón, permite el enriquecimiento de exosomas. Por tanto, el método de la presente invención considera anticuerpos dirigidos contra el dominio intracelular, extracelular o cualquier dominio de proteínas que se expresan preferiblemente y de manera diferencial en estructuras específicas del riñón, y tampón adecuado para permitir que los anticuerpos interaccionen con los dominios de proteínas presentes en la superficie externa de exosomas.

En una realización, el método de la presente invención puede incluir al menos un medio adicional para el enriquecimiento de exosomas, antes de la inmunopurificación.

Los medios para enriquecer la muestra de orina en exosomas también considerados en la invención son métodos y dispositivos de laboratorio útiles en la separación de elementos más grandes de la muestra de orina, que podrían interferir en la fase de detección posterior. Por ejemplo, los elementos interferentes pueden ser células del paciente. Los tubos de centrifuga pueden considerarse medios de enriquecimiento, puesto que el procesamiento en una centrífuga de laboratorio permite el enriquecimiento de exosomas, eliminando partículas más grandes, tales como por ejemplo células. En una realización, la muestra se centrifuga durante de 5 a 30 minutos a de 5000 a 10000 rpm. En otra realización, la muestra se ultracentrifuga durante de 30 a 120 minutos a de 30000 a 45000 rpm. Cartuchos de microfiltro, columnas de microfiltro, u otros medios de microfiltro, de hasta 0,22 micrómetros también se consideran como medios de enriquecimiento de exosomas, puesto que la microfiltración permite el paso de exosomas a través de microfiltros, enriqueciendo así la muestra de orina en exosomas.

En otra realización de la invención, el método considera, como medios para detectar y/o cuantificar un marcador de lesión renal predeterminado, un anticuerpo primario dirigido contra un marcador de lesión renal predeterminado, y un anticuerpo secundario conjugado con un marcador, dirigido contra el anticuerpo primario. El marcador del anticuerpo secundario puede ser un marcador fluorescente, una enzima, un marcador radiactivo, un compuesto químico, un compuesto infrarrojo.

Opcionalmente, el anticuerpo primario puede conjugarse directamente con un marcador, en cuyo caso, el anticuerpo secundario no es necesario. El anticuerpo primario también puede conjugarse con un marcador fluorescente, una enzima, un marcador radiactivo, un compuesto químico, un compuesto infrarrojo.

En una realización, la inmunopurificación de una fracción exosómica específica de una estructura renal específica se lleva a cabo con un anticuerpo seleccionado, pero no limitado a: anti-acuoporina-1 (anti-AQP-1),

anti-acuoporina-2 (anti-AQP-2), anti-acuoporina-3 (anti-AQP-3), anti-NKCC2, anti-NHE-3 y/o anti-NaPiII o una combinación de los mismos.

En una realización, el marcador de lesión renal específico se selecciona, pero no se limita a NGAL, cistatina-3, KIM-1, IL-1beta y/o IL-18, o una combinación de los mismos.

En una realización preferida, la inmunopurificación de una fracción exosómica específica de una estructura renal específica se lleva a cabo con anticuerpos dirigidos contra cualquier dominio de anti-AQP1, anti-AQP2, anti-AQP3, anti-NKCC2, anti-NHE-3, anti-NaPiII, o una combinación de los mismos como medios para enriquecer la muestra de orina en exosomas.

En una realización preferida adicional, el marcador de lesión renal específico se selecciona de NGAL, cistatina-3, KIM-1, IL-1beta, IL-18 o una combinación de los mismos.

En una realización más preferida, cuando se usa anti-AQP-1 para la inmunopurificación de una fracción exosómica específica de una estructura renal específica, el marcador de lesión renal cuya presencia y/o nivel se determina es NGAL y/o cistatina-3, cuando se usa anti-AQP-2 para la inmunopurificación de una fracción exosómica específica de una estructura renal específica, el marcador de lesión renal cuya presencia y/o nivel se determina es NGAL, y cuando se usa anti-AQP-3 para la inmunopurificación de una fracción exosómica específica de una estructura renal específica, el marcador de lesión renal cuya presencia y/o nivel se determina es KIM-1, IL-1beta y/o cistatina-3.

En una realización, cuando se usa anti-AQP-1 para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del túbulo proximal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-AQP-2 para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del túbulo distal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-AQP-3 para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del conducto colector, y la

presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-NKCC2 para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del asa de Henle, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-NHE-3 para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del túbulo proximal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-NaPiII para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del túbulo proximal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

El método incluye opcionalmente una etapa para evaluar la lesión renal aguda en un sujeto para la monitorización, el diagnóstico, el pronóstico y/o la determinación de un tratamiento en el sujeto basándose en la presencia y/o el nivel del marcador de lesión renal específico.

La invención comprende además un kit de diagnóstico para determinar la presencia y/o el nivel de un marcador de lesión renal específico, la determinación sencilla y temprana de la aparición de LRA en un sujeto, el kit que comprende medios para enriquecer la muestra de orina en exosomas, usando al menos una etapa de inmunopurificación, y medios para detectar un marcador de lesión renal predeterminado de un estado.

Opcionalmente, el kit de diagnóstico comprende medios para obtener una muestra de orina de un paciente. En una realización particular, los medios para obtener la muestra de orina se seleccionan de una sonda urinaria, en el caso de que el paciente no pueda proporcionar una muestra de orina por sí mismo; o un recipiente para alojar una muestra de orina de un paciente.

La presente invención considera como medios para enriquecer la muestra de orina en exosomas al menos una etapa de inmunopurificación. En particular, el uso de anticuerpos dirigidos contra el dominio intracelular, extracelular o cualquier dominio de proteínas particulares que se expresan preferiblemente y de manera diferencial en estructuras específicas del riñón,

permite el enriquecimiento de exosomas. Por tanto, el kit de la presente invención considera anticuerpos dirigidos contra el dominio intracelular, extracelular o cualquier dominio de proteínas que se expresan preferiblemente y de manera diferencial en estructuras específicas del riñón, y tampón de reacción adecuado para permitir que los anticuerpos interaccionen con los dominios de proteínas presentes en la superficie externa de exosomas. El kit también comprende disoluciones o agentes de bloqueo y disoluciones madre de los marcadores de lesión renal específicos.

En una realización, el kit comprende una placa de 96 pocillos en la que los pocillos se cubren con los anticuerpos dirigidos contra el dominio intracelular, extracelular o cualquier dominio de las proteínas particulares que se expresan preferiblemente y de manera diferencial en estructuras específicas del riñón, permitiendo el enriquecimiento de exosomas.

En una realización, el kit de la presente invención puede incluir al menos un medio adicional para el enriquecimiento de exosomas, antes de la inmunopurificación.

Los medios para enriquecer la muestra de orina en exosomas considerados en la invención son métodos y dispositivos de laboratorio útiles en la separación de elementos más grandes de la muestra de orina, que podrían interferir en la fase de detección posterior. Por ejemplo, los elementos interferentes pueden ser células del paciente. Tubos de centrifuga pueden considerarse medios de enriquecimiento, puesto que el procesamiento en una centrifuga de laboratorio permite el enriquecimiento de exosomas, eliminando partículas más grandes, tales como por ejemplo células. Cartuchos de microfiltro, columnas de microfiltro, u otros medios de microfiltro, de hasta 0,22 micrómetros también se consideran como medios de enriquecimiento de exosomas, puesto que microfiltración permite el paso de exosomas a través de microfiltros, enriqueciendo así la muestra de orina en exosomas.

En otra realización de la invención, el kit considera, como medios para detectar y/o cuantificar un marcador de lesión renal predeterminado, un anticuerpo primario dirigido contra un marcador de lesión renal predeterminado, y un anticuerpo secundario conjugado con un marcador, dirigido contra el anticuerpo primario. El marcador del anticuerpo secundario

puede ser un marcador fluorescente, una enzima, un marcador radiactivo, un compuesto químico, un compuesto infrarrojo.

Opcionalmente, el anticuerpo primario puede conjugarse directamente con un marcador, en cuyo caso, el anticuerpo secundario no es necesario. El anticuerpo primario también puede conjugarse con un marcador fluorescente, una enzima, un marcador radiactivo, un compuesto químico, un compuesto infrarrojo.

En una realización, el kit comprende anticuerpos seleccionados, pero no limitados a: anti-acuoporina-1 (anti-AQP-1), anti-acuoporina-2 (anti-AQP-2), anti-acuoporina-3 (anti-AQP-3), anti-NKCC2, anti-NHE-3 y/o anti-NaPill o una combinación de los mismos.

En una realización, el kit comprende anticuerpos primarios, o bien conjugados con un marcador o bien no para la detección de un marcador seleccionado, pero no limitado a NGAL, cistatina-3, KIM-1, IL-1beta, y/o IL-18 o una combinación de los mismos.

En una realización preferida, el kit comprende anticuerpos dirigidos contra cualquier dominio de anti-AQP1, anti-AQP2, anti-AQP3, anti-NKCC2, anti-NHE-3, anti-NaPill, o una combinación de los mismos como medios para enriquecer la muestra de orina en exosomas, cuando se usa inmunopurificación como método para el enriquecimiento.

En una realización preferida adicional, el kit comprende anticuerpos primarios, o bien conjugados con un marcador o bien no, para la detección de NGAL, cistatina-3, KIM-1, IL-1beta, IL-18.

En una realización más preferida, cuando se usa anti-AQP-1 para la inmunopurificación de una fracción exosómica específica de una estructura renal específica, el marcador de lesión renal cuya presencia y/o nivel se determina es NGAL y/o cistatina-3, cuando se usa anti-AQP-2 para la inmunopurificación de una fracción exosómica específica de una estructura renal específica, el marcador de lesión renal cuya presencia y/o nivel se determina es NGAL, y cuando se usa anti-AQP-3 para la inmunopurificación de una fracción exosómica específica de una estructura renal específica, el marcador de lesión renal cuya presencia y/o nivel se determina es KIM-1, IL-1beta y/o cistatina-3.

En una realización, cuando se usa anti-AQP-1 para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal

específica, la fracción exosómica procede del túbulo proximal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-AQP-2 para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del túbulo distal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-AQP-3 para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del conducto colector, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-NKCC2 para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del asa de Henle, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-NHE-3 para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del túbulo proximal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-NaPiII para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del túbulo proximal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

El kit de la invención incluye opcionalmente instrucciones de uso del kit.

El método y el kit de la invención comprenden una etapa de inmunopurificación de exosomas de orina. Por tanto, la invención también describe un método para la inmunopurificación de exosomas de orina y el uso de anticuerpos para purificar exosomas de orina.

La invención describe un método para purificar exosomas de orina, comprendiendo el método las etapas de (a) incubar una muestra de orina, u opcionalmente, una muestra de orina descelularizada con un anticuerpo dirigido contra el dominio intracelular, extracelular o cualquier dominio de proteínas expresadas preferiblemente y de manera diferencial en la superficie de diferentes estructuras renales, formando así un complejo

exosoma-anticuerpo; (b) incubar el complejo exosoma-anticuerpo que resulta de (a) con una etiqueta que reconoce cualquier región del anticuerpo y se une a un agente insoluble, formando así un complejo exosoma-anticuerpo-etiqueta-agente insoluble; (c) separar el complejo exosoma-anticuerpo-etiqueta-agente insoluble del sobrenadante; (d) lavar el complejo exosoma-anticuerpo-etiqueta-agente insoluble con un tampón adecuado.

En una realización la muestra de orina, o muestra de orina descelularizada se incuba desde 20 hasta 60 minutos con el anticuerpo, en un tampón adecuado, a temperatura ambiente.

En una realización, los anticuerpos usados en el método de purificación para exosomas de orina se seleccionan, pero no se limitan a: anti-acuoporina-1 (anti-AQP-1), anti-acuoporina-2 (anti-AQP-2), anti-acuoporina-3 (anti-AQP-3), anti-NKCC2, anti-NHE-3 y/o anti-NaPiII o una combinación de los mismos.

En una realización preferida, los anticuerpos usados en el método de purificación para exosomas de orina están dirigidos contra cualquier dominio de anti-AQP1, anti-AQP2, anti-AQP3, anti-NKCC2, anti-NHE-3, anti-NaPiII, o una combinación de los mismos.

En una realización, cuando se usa anti-AQP-1 para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del túbulo proximal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-AQP-2 para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del túbulo distal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-AQP-3 para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del conducto colector, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-NKCC2 para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del asa de Henle, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-NHE-3 para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del túbulo proximal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

5 En una realización, cuando se usa anti-NaPiII para la inmunopurificación de una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del túbulo proximal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

10 En una realización, la etiqueta que reconoce cualquier región del anticuerpo es proteína A o proteína G o fracciones de las mismas, unidas a perlas de agarosa o Sepharose.

En otra realización, la etiqueta es biotina o una fracción de la misma, y se une al anticuerpo. Por tanto, se forma el complejo exosoma-anticuerpo-biotina. En esta realización, el agente insoluble son perlas magnéticas unidas a un compuesto con afinidad por biotina o una fracción de la misma, tal como, pero sin limitarse a un anticuerpo. Por tanto, añadiendo las perlas magnéticas, se forma el complejo exosoma-anticuerpo-biotina-compuesto con afinidad por biotina-perla magnética y luego se separa en la siguiente etapa.

20 En una realización, la separación del exosoma-anticuerpo-etiqueta-agente insoluble del sobrenadante se realiza mediante centrifugación o sedimentación.

La invención también da a conocer el uso de un anticuerpo o una combinación de anticuerpos dirigidos contra el dominio intracelular, extracelular o cualquier dominio de proteínas expresadas preferiblemente y de manera diferencial en la superficie de diferentes estructuras renales para la inmunopurificación de exosomas de orina.

25 En una realización, los anticuerpos usados para la inmunopurificación de exosomas de orina se seleccionan, pero no se limitan a: anti-acuoporina-1 (anti-AQP-1), anti-acuoporina-2 (anti-AQP-2), anti-acuoporina-3 (anti-AQP-3), anti-NKCC2, anti-NHE-3 y/o anti-NaPiII o una combinación de los mismos.

30 En una realización preferida, los anticuerpos usados para la inmunopurificación de exosomas de orina están dirigidos contra cualquier

dominio de anti-AQP1, anti-AQP2, anti-AQP3, anti-NKCC2, anti-NHE-3, anti-NaPiII, o una combinación de los mismos.

En una realización, cuando se usa anti-AQP-1 para la inmunopurificación de exosomas de orina una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del túbulo proximal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-AQP-2 para la inmunopurificación de exosomas de orina una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del túbulo distal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-AQP-3 para la inmunopurificación de exosomas de orina una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del conducto colector, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-NKCC2 para la inmunopurificación de exosomas de orina una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del asa de Henle, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-NHE-3 para la inmunopurificación de exosomas de orina una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del túbulo proximal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

En una realización, cuando se usa anti-NaPiII para la inmunopurificación de exosomas de orina una fracción específica de una estructura renal específica, la fracción exosómica procede del túbulo proximal, y la presencia y/o el nivel de un marcador específico indica lesión en dicha estructura.

El método y kit de la invención tienen la ventaja de proporcionar una detección específica, sencilla y temprana de marcadores de lesión renal, lo que no es posible con los métodos convencionales aplicados hasta ahora. El

método y kit de la invención también proporcionan la ventaja de identificar la estructura específica que presenta la lesión en el riñón, puesto que usa anticuerpos específicos para proteínas específicas presentes en estructuras específicas del riñón.

El método y kit de la presente invención pueden usarse para la monitorización, el diagnóstico, el pronóstico y/o la determinación del tratamiento en cualquier sujeto. Particularmente, el método y kit de la invención son útiles para la monitorización del desarrollo de lesión renal en pacientes que se someten a trasplante de riñón, debido al proceso de isquemia-reperfusión asociado con el trasplante. El método y kit de la invención son también útiles para la monitorización, el diagnóstico, el pronóstico y/o la determinación del tratamiento en pacientes en la unidad de cuidados intensivos (UCI) que podrían desarrollar LRA y necesitar una detección temprana.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Inmunotransferencia de tipo Western representativa que compara la abundancia de NGAL en la fracción celular y la fracción exosómica de una muestra de orina de un paciente con trasplante de riñón en los días tras el trasplante 1, 2, 3 y 4.

Figura 2: Inmunotransferencia de tipo Western representativa que muestra la abundancia de NGAL-24 y NGAL-46 en orina completa (U) y la fracción exosómica (E) de un paciente en el día 1 tras el trasplante.

Figura 3: Representación gráfica de NGAL en la fracción exosómica total de orina en pacientes en el día 1 tras el trasplante. UA= Unidades arbitrarias.

Figura 4: Relación entre NGAL-46 y AQP 1, 2 y 3 (* $p < 0,05$, $n=5$), UA= Unidades arbitrarias.

Figura 5: Análisis comparativo entre dos niveles de CRS y NGAL en individuos con trasplante de riñón.

Figura 6: Abundancia relativa de NGAL (unidades arbitrarias) en orina libre de exosomas (barras blancas, EF-U) y fracción exosómica total (barras negras, TE) en pacientes en la UCI clasificados como LRA1 (5 pacientes), LRA2 (3 pacientes) y LRA 3 (5 pacientes).

Figura 7: Razón TE/EF-U de abundancia de NGAL en unidades arbitrarias en pacientes de la UCI clasificados como LRA1 (5 pacientes), LRA2 (3 pacientes) y LRA3 (5 pacientes).

Figura 8: Abundancia relativa de NGAL en orina libre de exosomas (EF-U), exosomas totales (TE) y exosomas sometidos a inmunopurificación (IP-E) en pacientes en la UCI clasificados como LRA1 (5 pacientes).

SECCIÓN EXPERIMENTAL

En esta sección, se facilitan ejemplos ilustrativos como orientación, por tanto, estos ejemplos no han de interpretarse como limitativos en modo alguno.

Ejemplos de aplicación

Algunas de las realizaciones de la presente invención se describen a continuación, basándose en un estudio que determina la lesión renal o del riñón en un grupo de 12 pacientes humanos que se sometieron a trasplante de riñón y un estudio comprendía 28 individuos ingresados en la UCI, en los que el 46% (13/28) desarrolló LRA según la clasificación RIFLE.

Ejemplo 1: Descripción del grupo en estudio

Se sometieron a prueba el método y los productos de la presente invención analizando un grupo de 12 pacientes humanos, más individuos sanos que actuaron como grupo control. Los criterios de inclusión usados para los controles sanos fueron la ausencia de sintomatología renal y los criterios de inclusión para los pacientes fueron todos los individuos que se sometieron a trasplante de riñón durante el periodo de duración del presente estudio. Se incluyeron los pacientes considerando una aprobación de consentimiento informado.

Ejemplo 2: Muestras de orina

Se obtuvo una muestra de 50 ml de orina con catéter de cada individuo en estudio. Se tomó la muestra de la primera micción de la mañana, por un enfermero cualificado. En el caso de individuos trasplantados, se obtuvieron las muestras el día antes del trasplante y tres muestras tras la cirugía en los tres días siguientes, una vez al día, de las

que, se eligió para el análisis la primera muestra tras la cirugía. Se mantuvieron las muestras a -80°C a la espera del análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western.

Ejemplo 3: Preparación de exosomas de orina

Se obtuvieron los exosomas considerando dos enfoques diferentes. El primero, correspondió a una separación en centrífuga en dos etapas, usando la primera centrifugación, y usando la segunda etapa ultracentrifugación. El segundo método, la principal característica de la presente invención, consideró una primera fase de centrifugación, y una segunda etapa de inmunopurificación.

En el primer método, con 2 etapas de centrifugación, se tomaron 10 ml de la muestra de orina, a los que se añadieron una pastilla de inhibidores de proteasas (pastillas de cóctel de inhibidores de proteasas Complete Mini, Roche). Se realizó una primera centrifugación a 17.000 g durante 15 minutos a 4°C para separar el contenido celular, que se almacenó a -80°C, obteniendo una primera fracción de sobrenadante (S1). Además se sometió a ultracentrifugación una primera fracción de S1 a 38.000 rpm durante 1 hora, lo que originó una segunda fracción de sobrenadante (S2) y un precipitado (exosomas totales).

En el caso de una primera etapa de centrifugación, considerando una segunda etapa la inmunopurificación, se usó una fracción de S1, obtenida tal como se describió en la primera etapa para el método con 2 etapas de centrifugación, para la inmunopurificación de exosomas usando anticuerpos contra AQP1, AQP2 o AQP3 para obtener exosomas de diferentes regiones del riñón. Se resuspendieron las muestras en un tampón de carga (Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, ditiotretitol (DTT) 200 mM, SDS al 4%, azul de bromofenol al 0,2%, glicerina al 20%), de modo que se cargasen 100 microgramos de proteínas totales de cada muestra en un gel.

Ejemplo 4: Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western

La inmunotransferencia de tipo Western permitió la identificación de la presencia de proteínas usando anticuerpos específicos. Se separaron las proteínas según su tamaño usando electroforesis en geles de acrilamida al 7,5% y 12% (SDS-PAGE) durante 90 minutos a 100 V. Una vez separadas,

se transfirieron todas las proteínas a membranas de nitrocelulosa durante 90 minutos a 300 mA. Después de este proceso, se bloquearon las membranas usando leche desnatada al 5% con agitación constante durante 1 hora, para la incubación posterior con anticuerpos primarios anti-AQP1 (Santa Cruz Biotechnology), anti-AQP2 (Santa Cruz Biotechnology), anti-AQP3 (Santa Cruz Biotechnology) o anti-NGAL (R&D Systems), durante la noche a 4°C con agitación. Una vez finalizada la incubación, se lavaron las membranas 3 veces con PBS al 1%-Tween 20 (Winkler), para proceder con un anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Finalmente, se lavaron las membranas 3 veces con PBS al 1%-Tween 20 para procesamiento adicional.

Se determinó la abundancia de proteínas mediante un análisis semicuantitativo, usando la determinación densitométrica de bandas obtenidas mediante inmunotransferencia de tipo Western, usando el software Adobe Photoshop CS4, con 2 mediciones (banda total y una banda de tamaño fijo para todas las muestras) para cada banda obtenida de modo que se normalizase la determinación.

Determinación de proteínas

Se determinó la concentración total en ambas fracciones celulares, usando un kit disponible comercialmente (reactivo de ensayo de proteínas BCA, Pierce).

Análisis estadístico

Se llevaron a cabo un estudio descriptivo y uno asociativo usando el modelo estadístico ANOVA. Se realizó el análisis usando el software WINKS SDA 6.0, considerándose como diferencias significativas con un valor de $p \leq 0,05$.

Ejemplo 5: Resultados del análisis según el método de la presente invención

Características del estudio en grupos

Se consideraron 12 pacientes que recibieron un trasplante de riñón en el presente estudio.

Las edades de los pacientes oscilaron entre los 15 y 60 años, aunque la mayor parte de los pacientes (7 de 12) tenían entre 40 y 60 años. La mayor parte de los pacientes eran hombres (91,6%). El 25% recibió un órgano de un donante cadáver y el 75% de un donante vivo (tabla 4).

5 La creatinina en suero es un parámetro importante para someter a prueba la viabilidad del órgano trasplantado. El primer día después del trasplante, todos los pacientes tenían valores para la creatinina en suero mayor de lo normal (de 0,8 a 1,4 mg/dl), mostrando valores mayores los pacientes que recibieron el órgano de un donante cadáver (tabla 4).

10 Otro parámetro considerado fue el tiempo de isquemia al que estuvo sometido el órgano, antes del trasplante. Los tiempos oscilan entre 27 y 1182 minutos, siendo en general los mayores tiempos para aquellos pacientes que recibieron el órgano de un donante cadáver, oscilando los tiempos entre 300 y 1182 minutos, en comparación con los tiempos de
15 pacientes que recibieron el órgano de un donante vivo, entre 27 y 360 minutos (Tabla 4).

Tabla 4. Información de pacientes en el estudio

N.º de paciente	Edad (años)	Sexo	Tipo de donante	CRS día +I (mg/dl)	Tiempo de isquemia (minutos)
1	60	M	DC	12,5	1182
2	57	M	DV	7,4	27
3	16	M	DC	6,1	300
4	34	M	DV	4,8	120
5	15	F	DV	2,3	N/D
6	27	M	DV	4,7	90
7	42	M	DV	9,3	360

8	46	M	DV	2,7	N/D
9	46	M	DV	6,1	N/D
10	55	M	DV	5,5	120
11	28	M	DV	2,8	60
12	42	M	DC	9,0	720

Sexo: M=masculino, F=femenino; Tipo de donante DC= donante cadáver, DV= donante vivo; CRS día+ 1= creatinina en suero 1 día tras el trasplante; Tiempo de isquemia: N/D= sin datos disponibles.

5 **Análisis de biomarcadores de insuficiencia renal**

Los resultados previos obtenidos por este equipo de investigación y los resultados del presente estudio, muestran que en individuos sanos no hay niveles detectables de biomarcadores ni en la fracción celular ni en la fracción exosómica de orina (Flores M., Marquez S. 2009, Research unit: New molecular markers for the study of kidney transplant dysfunction, Universidad de los Andes, Santiago, Chile). También, los niveles de expresión de biomarcadores en la fracción exosómica son mayores que los expresados en la fracción celular (figura 1). Además, se producen mayores niveles de expresión de biomarcadores en estudio el primer día tras el trasplante (figura 1). Finalmente, usando inmunotransferencia de tipo Western es posible detectar dos isoformas de NGAL, NGAL-23 de 23 kDa y NGAL-46 de 46 kDa (figura 1). Por tanto, el presente estudio se centra en la determinación del perfil de biomarcadores a partir de la fracción exosómica de una muestra de orina recogida el primer día tras el trasplante.

20

NGAL

Se analizó la abundancia de todas las isoformas de NGAL (NGAL-23 y NGAL-46) a partir de los exosomas de orina totales del primer día tras el trasplante, usando técnicas de inmunotransferencia de tipo Western, en 12 pacientes incluidos en el estudio, obteniendo información para 11 de ellos. Estos resultados muestran que NGAL se expresó en casi todos los casos. El

25

intervalo de expresión fue de entre 7,3 y 170,3 UA, es decir aproximadamente 20 veces de diferencia entre los casos extremos (figura 3).

Usando inmunotransferencia de tipo Western para identificar NGAL-46 y NGAL-24, ambos marcadores se expresan sólo en la fracción exosómica urinaria, mientras que el sobrenadante sólo muestra una banda no específica (figura 2).

De 11 pacientes, aquéllos con mayores valores de NGAL fueron los pacientes 5 y 7, con valores de 170,3 y 83.8 UA, respectivamente.

Se halló el menor nivel para el paciente 10 con un valor de 12,6 UA y el paciente 2, con 7,9 UA.

Expresión de biomarcadores en exosomas sometidos a inmunopurificación

Pisitkun en 2004 (Pisitkun T., Shen R.F., Knepper M.A. 2004, Proc Natl Acad Sci USA, 101:13368-13373) describió la presencia de acuaporinas (AQP) en exosomas de orina de pacientes normales. Por tanto, el presente estudio examinó la expresión de las AQP (AQP1, AQP2, AQP3) en exosomas sometidos a inmunopurificación de pacientes que se sometieron a trasplante renal. La elección de cada uno de estos componentes se debe a que su expresión está asociada con zonas específicas en la nefrona. AQP1 se asocia habitualmente con los túbulos proximales (Knepper M.A. 1997, Am J Physiol, 272:F3-F12), AQP2 se asocia con los túbulos distales y los conductos colectores (Ma T., Yang B., Gillespie A., Carlson E.J., Epstein C.J., Verkman A.S. 1998, J Biol Chem, 273:4296-4299), y AQP3 se asocia con los conductos colectores de la nefrona (Sasaki S., Ishibashi K., Marumo F. 1998, Annu Rev Physiol, 60:199-220).

Este análisis permite determinar la abundancia de cada biomarcador presente en un tipo particular de exosoma. Por tanto, el enfoque es establecer una relación entre el posible origen del biomarcador de lesión renal analizado.

NGAL-46

La figura 4 muestra la normalización de la isoforma NGAL-46 mediante el nivel de AQP en exosomas de orina de pacientes con

información positiva. Se eligió NGAL-46 puesto que la expresión de NGAL-46 es mayor que la de NGAL-23 (figura 1). Los resultados muestran que la abundancia de NGAL en relación con la abundancia de AQP1 es estadísticamente mayor que la de las otras AQP (figura 4, $p < 0,05$). Estos resultados sugieren que los exosomas que contienen AQP1 tienen una mayor abundancia de NGAL (figura 4). Basándose en estos resultados, se muestra que NGAL-46 se asocia principalmente con regiones del riñón en las que se expresa preferentemente AQP1, es decir la zona proximal del conducto colector.

Comparación de los niveles en suero de creatinina con NGAL

Resultados que comparan los niveles de NGAL y creatinina en suero (CRS) muestran que individuos con niveles de CRS menores de 3 mg/dl (pacientes 5, 8 y 11) o mayores de 6 mg/dl (pacientes 1, 2, 3, 7, 9 y 12), no presentan una correlación con NGAL (figura 5).

Los datos sugieren que los marcadores de filtración glomerular (CRS) no se correlacionan con los marcadores de lesión renal (NGAL).

Discusión

Análisis de biomarcadores de lesión renal NGAL

Flores y Marquez (2009) (Flores M., Marquez S. 2009, Research unit: New molecular markers for the study of kidney transplant dysfunction, Universidad de los Andes, Santiago, Chile) mostraron que no hay niveles detectables de NGAL en la fracción exosómica de orina de individuos sanos. 11 de los pacientes del presente estudio para los que se disponía de información mostraron que NGAL se detectaba en el 100% de los exosomas de orina de pacientes que se sometieron a trasplante renal pero que no se detectaba en el sobrenadante libre de la fracción celular de orina. Los niveles de expresión son de entre 7,9 y 170,3 UA, con más de 22 veces entre los individuos extremos. Por tanto, los datos sugieren que la detección de NGAL en exosomas de orina constituye un excelente biomarcador para lesión renal, puesto que la fracción analizada era más representativa que la orina completa.

Relación de NGAL con el tipo de donante

Se sabe que la calidad del órgano trasplantado es mejor cuando el donante está vivo en comparación con un donante cadáver, lo que debe reflejarse como una menor expresión de marcadores de lesión renal. Se mostró este tipo de comportamiento en los pacientes 2, 6, 9 y 10, con los menores niveles de NGAL y también recibieron el órgano trasplantado de un donante vivo. En el mismo contexto, el paciente 1 muestra un mayor nivel de NGAL, que puede explicarse puesto que este paciente recibió un trasplante de un donante cadáver. No obstante, este patrón de expresión de NGAL no se muestra por el paciente 3, que recibió un trasplante de un donante cadáver y muestra niveles moderados de NGAL, y por tanto podría interpretarse como la calidad del órgano.

Los pacientes 5 y 7 muestran mayores niveles de NGAL aunque recibieron un riñón de un donante vivo. El paciente 7 mostró una función retardada del riñón trasplantado, requiriendo hemodiálisis durante la primera semana tras el trasplante. Por tanto, NGAL es un excelente marcador para lesión renal.

Relación de NGAL con el tiempo de isquemia

El tiempo de isquemia de un órgano es un factor determinante del daño que sufre el órgano antes del trasplante, puesto que cuanto más largo sea este tiempo, menos función tendrá. Esto se observa en los pacientes 1 y 7, que tienen una alta expresión de NGAL relacionada con valores de isquemia de 360 y 1182 minutos. Se observa lo contrario en los pacientes 2 y 6, con valores de isquemia de 27 y 90 minutos. Esta relación puede establecerse en la mayor parte de los casos, con excepción del paciente 11, con un valor bajo del tiempo de isquemia y altos niveles de NGAL (tabla 4, figura 3). El paciente 5 muestra el mayor nivel de NGAL del grupo, pero no se dispone de datos del tiempo de isquemia.

Relación de NGAL con la edad y el sexo

Según los resultados obtenidos en el presente estudio, la edad no parece tener ninguna relación con los niveles de NGAL para cada paciente, puesto que, por ejemplo el paciente 5 muestra los mayores niveles de NGAL (figura 3) aunque es la persona más joven en el estudio. No es posible

tampoco establecer una relación entre el sexo del paciente y el marcador, puesto que el estudio sólo incluyó una mujer.

Expresión de biomarcadores en exosomas sometidos a inmunopurificación

AQP1, AQP2 y AQP3

Se analizó la abundancia de biomarcadores en exosomas sometidos a inmunopurificación con diferente tipos de AQP.

Knepper 1997 (Knepper M.A. 1997, Am J Physiol, 272:F3-F12), mostró que AQP1 se asocia preferentemente con los túbulos proximales, mientras que AQP2 se asocia con los túbulos distales y los conductos colectores (Ma T., Yang B., Gillespie A., Carlson E.J., Epstein C.J., Verkman A.S. 1998, J Biol Chem, 273:4296-4299), y AQP3 se asocia con los conductos colectores de la nefrona (Sasaki S., Ishibashi K., Marumo F. 1998, Annu Rev Physiol, 60:199-220).

Pisitkun en 2004 (Pisitkun T., Shen R.F., Knepper M.A. 2004, Proc Natl Acad Sci USA, 101: 13368-13373) mostró que las AQP estaban presentes en exosomas de orina de pacientes normales.

El presente estudio muestra que, las AQP, además de estar presentes en exosomas de orina de pacientes normales también están presentes en todos los pacientes sometidos a trasplante renal, independientemente del estado del órgano o el donante en el momento del trasplante (tabla 4).

Relación entre componentes de membrana y biomarcadores

Considerando que AQP1 se asocia con los túbulos proximales en nefronas ((Knepper M.A. 1997, Am J Physiol, 272:F3-F12), y AQP2 se asocia con los túbulos distales, y AQP3 se asocia con los conductos colectores, se analizó la abundancia de NGAL en exosomas sometidos a inmunopurificación con AQP1, AQP2 y AQP3.

NGAL

La expresión de NGAL en cada uno de los exosomas sometidos a inmunopurificación sugiere una abundancia significativamente mayor de NGAL en exosomas con AQP1 en sus membranas ($p < 0,05$, figura 4),

seguido por los exosomas con AQP2 y AQP3, sin diferencia significativa entre los dos últimos. Los datos sugieren que los exosomas que proceden del túbulo proximal del riñón tienen una mayor abundancia del marcador de lesión renal NGAL.

5

Conclusiones

El análisis de biomarcadores en lesión renal el primer día tras el trasplante permitió la detección de biomarcadores usando técnicas de inmunotransferencia de tipo Western con la fracción exosómica de orina, pero no con orina completa. Estos biomarcadores no son detectables usando esta técnica en pacientes sanos.

10

15

20

NGAL está presente en la fracción exosómica de muestras de orina tomadas el primer día tras el trasplante del riñón en todos los pacientes analizados, lo que sugiere que la expresión de factores moleculares en los exosomas se debe al desarrollo de lesión renal en el trasplante, asociada con el procedimiento de trasplante. De manera interesante, los pacientes 1, 4 y 7 mostraron conjuntamente altos niveles de NGAL. De estos pacientes, 1 y 7 mostraron una función retardada del trasplante, requiriendo terapia de diálisis durante la primera semana tras el trasplante. Estos resultados preliminares, muestran que los niveles aumentados de NGAL en exosomas de orina desempeñan un papel crítico en el establecimiento de disfunción renal en los trasplantes renales.

25

El uso de métodos cuantitativos para la determinación de la abundancia de estos marcadores, por ejemplo usando ELISA, permite establecer límites para determinar el grado de lesión renal asociada con el trasplante renal y sus implicaciones en la función y viabilidad del trasplante.

Basándose en el análisis, NGAL se expresa principalmente en exosomas de orina obtenidos de los túbulos proximales.

30

Ejemplo 6: Descripción del grupo en estudio

Se usaron los mismos procedimientos usados en ejemplos anteriores en cuanto al análisis estadístico, la preparación de muestras, los protocolos de inmunotransferencia de tipo Western, orina total, exosomas totales, exosomas sometidos a inmunopurificación.

En este ejemplo, se obtuvieron muestras de orina de 30 ml de la segunda micción y se mantuvieron en un recipiente estéril, de pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos (UCI). Se mantuvieron las muestras a -80°C hasta su procesamiento adicional y el análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western.

Grupo de estudio

El grupo de estudio comprendía 28 individuos ingresados en la UCI, con edades que oscilaban entre 21 y 95 años, 19 hombres y 9 mujeres. El 46% (13/28) desarrolló LRA según la clasificación RIFLE.

En la tabla 5 a continuación se muestran la edad, el sexo y la fase de LRA determinada según métodos habituales.

Tabla 5. Información de pacientes en el estudio.

N.º de paciente	Edad (años)	Sexo	Fase de LRA
1	64	M	LRA3
2	75	M	LRA3
3	34	M	N
4	59	F	N
5	95	M	LRA1
6	82	F	N
7	23	M	LRA3
8	21	M	LRA3
9	74	M	LRA1
10	79	F	LRA2
11	87	F	N
12	34	M	N
13	40	F	N
14	76	M	N
15	27	M	N
16	39	M	LRA2
17	57	F	N

18	82	M	N
19	37	M	N
20	55	F	N
21	54	F	N
22	41	M	LRA1
23	44	F	LRA1
24	22	M	LRA2
25	48	M	LRA1
26	38	M	N
27	85	M	LRA1
28	86	M	N

M: hombre, F: mujer, N: sin LRA

Al 46% de los 28 pacientes se les diagnosticó LRA, 9 eran mujeres (32%) y 19 hombres (68%). La clasificación según la fase de LRA muestra que un mayor número de hombres son el constituyente principal del grupo.

5 El 57% (16 pacientes) eran mayores de 45 años, aunque no se observa ninguna relación en cuanto a la fase de LRA y la edad.

Ejemplo 7: Análisis de biomarcadores de lesión renal en exosomas totales, orina libre de exosomas y exosomas sometidos a inmunopurificación.

10 Se analizó el biomarcador de LRA, NGAL, mediante técnicas de inmunotransferencia de tipo Western en orina libre de exosomas (EF-U), fracción exosómica total (TE) y exosomas sometidos a inmunopurificación (IP-E). De los 28 pacientes en el estudio, 17 mostraron niveles detectables de NGAL usando la técnica de inmunotransferencia de tipo Western. La

15 tabla 6 a continuación muestra los resultados para la detección de biomarcadores en los pacientes del estudio.

Tabla 6. Detección de biomarcadores en los pacientes.

N.º de paciente	NGAL	Fase de LRA
1	+	LRA3

2	+	LRA3
3	-	N
4	+	N
5	+	LRA1
6	+	N
7	+	LRA3
8	+	LRA3
9	+	LRA1
10	+	LRA2
11	-	N
12	+	N
13	-	N
14	-	N
15	-	N
16	+	LRA2
17	+	N
18	-	N
19	-	N
20	+	N
21	-	N
22	+	LRA1
23	+	LRA1
24	+	LRA2
25	+	LRA1
26	-	N
27	+	LRA1
28	-	N

+: presencia de biomarcador, -: ausencia de biomarcador

El 100% (13/13) de los pacientes a los que se les diagnosticó LRA (13/28) tiene NGAL detectable en al menos una de las fracciones

estudiadas. En el caso de pacientes con diagnóstico negativo para LRA, el 33% muestra NGAL positivo.

Además, en pacientes clasificados con LRA, la abundancia de NGAL fue mayor en la fracción exosómica en el 85% de los casos, en comparación con la fracción EF-U. 5 pacientes, con diagnóstico de LRA, mostró expresión preferente de NGAL en la fracción exosómica (pacientes 5, 8, 9, 12 y 16), mientras que sus niveles de NGAL en la fracción EF-U fueron extremadamente bajos. Sólo 2 pacientes con diagnóstico de LRA y NGAL positivos mostraron una abundancia equivalente de NGAL en ambas fracciones (pacientes 2 y 7).

En el grupo con un diagnóstico de LRA negativo, el 60% muestra niveles no detectables de NGAL. Todos los pacientes clasificados con diagnóstico de LRA negativo y NGAL positivo, mostraron mayores niveles de NGAL en la fracción exosómica.

Tabla 7: Abundancia relativa de NGAL en fracciones de orina analizadas en los pacientes.

N.º de paciente	NGAL EF-U	Exosomas totales	Fase de LRA
1	+	++	LRA3
2	++	++	LRA3
3	-	-	N
4	+	++	N
5	-	+	LRA1
6	+	++	N
7	++	++	LRA3
8	-	+	LRA3
9	-	+	LRA1
10	+	++	LRA2
11	-	-	N
12	-	++	N

13	-	-	N
14	-	-	N
15	-	-	N
16	-	+	LRA2
17	-	+	N
18	-	-	N
19	-	-	N
20	-	+	N
21	-	-	N
22	+	++	LRA1
23	+	++	LRA1
24	+	++	LRA2
25	+	++	LRA1
26	-	-	N
27	+	++	LRA1
28	-	-	N

+: presencia de NGAL, -: ausencia de NGAL

Se clasificaron los pacientes en tres fases de LRA, siendo LRA3 la más grave. De 13 pacientes a los que se les diagnosticó LRA, 5 se clasificaron como LRA1 y los 5 (100%) mostraron mayor abundancia de NGAL en la fracción exosómica. De los 3 pacientes a los que se les diagnosticó LRA2, 3 mostraron mayor abundancia de NGAL en la fracción exosómica. De los 5 pacientes a los que se les diagnosticó LRA3, 3 (60%) mostraron mayor abundancia de NGAL en la fracción exosómica (tabla 7).

Además, se analizó la abundancia relativa de NGAL entre orina libre de exosomas (EF-U) y fracción de exosomas totales (TE). Se determinaron por separado los niveles de NGAL en la orina de pacientes ingresados en la UCI y a los que se les diagnosticó LRA1, LRA2 y LRA3. Los resultados muestran claramente que con un nivel creciente de lesión, también aumenta la abundancia de NGAL, aunque la abundancia de NGAL es mayor en TE en comparación con EF-U en el caso de LRA1 y LRA2 (figura 6).

En el grupo de pacientes con un diagnóstico de LRA negativo, el 33% (5/15) mostraron niveles detectables de NGAL en la fracción TE. Los niveles

de abundancia de NGAL en esta fracción fueron en promedio de $13,5 \pm 9,8$ UA. Estos niveles fueron significativamente menores que los hallados en TE de pacientes con LRA1 ($79,6 \pm 22$ UA, figura 6). Esto podría interpretarse como una lesión renal incipiente que no se detectó mediante los niveles en suero de creatinina.

Los datos anteriores muestran que la medición de NGAL en TE es un método con una mayor sensibilidad para el diagnóstico de LRA 24 horas antes del diagnóstico de LRA usando la creatinina en suero.

Para comparar la abundancia relativa de NGAL en las fracciones TE y EF-U, se calculó la razón TE/EF-U. Los resultados (figura 7) muestran que la abundancia de NGAL es 45 veces mayor en TE en comparación con EF-U en el caso de LRA1, 13 veces mayores en el caso de LRA2. No obstante, los pacientes a los que se les diagnosticó LRA3 no mostraron diferencia significativa. Los datos muestran que NGAL en exosomas de orina tiene una alta sensibilidad en la detección temprana de LRA (LRA1 y LRA2) en un periodo de 24 horas antes de establecer el diagnóstico de LRA usando el método de la creatinina en suero.

Puesto que los resultados anteriores muestran una mayor abundancia de NGAL en exosomas totales (TE) en pacientes con LRA1, se analizó además la abundancia de NGAL en exosomas sometidos a inmunopurificación (IP-E). Se usó AQP1 para someter a inmunopurificación los exosomas en pacientes a los que se les diagnosticó LRA1. Se comparó la abundancia de NGAL en la fracción IP-E con las fracciones TE y EF-U. Los resultados muestran que la abundancia de NGAL en IP-E es mayor que en TE e incluso mayor que en las fracciones EF-U (figura 8).

Los datos muestran que la inmunopurificación de exosomas procedentes de la sección del túbulo proximal de la nefrona aumenta la abundancia de NGAL y por tanto la sensibilidad en la detección temprana de LRA en pacientes críticos.

El análisis para el grupo de 28 pacientes de este ejemplo permite establecer que la determinación de NGAL en orina es un buen método para el diagnóstico de LRA, en un periodo de 24 horas antes de lo que permite el método habitual de los niveles de creatinina en suero.

La abundancia de NGAL en la fracción exosómica es mayor que en la fracción de orina libre de exosomas, mostrando así un método de mayor

sensibilidad para el diagnóstico temprano de LRA, en particular para fases LRA1 y LRA2.

La inmunopurificación de exosomas permite aumentar la sensibilidad de detección de LRA debido a la mayor abundancia de NGAL en exosomas sometidos a inmunopurificación con AQP1.

Dado que otras patologías pueden aumentar los niveles de NGAL en orina, el análisis de exosomas sometidos a inmunopurificación permite establecer que el NGAL medido procede del riñón, aumentando la especificidad en la determinación de biomarcadores exosómicos para la detección temprana de LRA.

REIVINDICACIONES

1. Método para la monitorización, el diagnóstico y/o el pronóstico de lesión renal aguda en fase temprana y la determinación del tratamiento en sujetos que padecen la misma, comprendiendo el método las siguientes etapas:
 - (a) proporcionar una muestra de orina;
 - (b) enriquecer la muestra de orina en exosomas presentes en la muestra de orina usando al menos una etapa de inmunopurificación;
 - (c) detectar y/o cuantificar un marcador de lesión renal aguda (LRA) en los exosomas.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de inmunopurificación se realiza con anticuerpos dirigidos contra el dominio intracelular, extracelular o cualquier dominio de proteínas expresadas preferiblemente y de manera diferencial en la superficie de diferentes estructuras renales.
3. Método según la reivindicación 2, en el que los anticuerpos para la etapa de inmunopurificación se seleccionan de anti-acuaporina 1 (anti-AQP1), anti-acuaporina 2 (anti-AQP2) y anti-acuaporina 3 (anti-AQP3), anti-NKCC2, anti-NHE-3, anti-NaPiII o una combinación de los mismos.
4. Método según la reivindicación 3, en el que los anticuerpos para la etapa de inmunopurificación están dirigidos contra cualquier dominio de acuaporina 1 (AQP1), acuaporina 2 (AQP2), acuaporina 3 (AQP3), NKCC2, NHE-3 y NaPiII.
5. Método según la reivindicación 4, en el que el enriquecimiento de la muestra de orina en exosomas incluye al menos un medio adicional para el enriquecimiento de exosomas, antes de la inmunopurificación.

6. Método según la reivindicación 5, en el que el medio adicional para el enriquecimiento de la muestra de orina en exosomas es una etapa de centrifugación, una etapa de microfiltración, o una combinación de las mismas, originando así una muestra de orina descelularizada.
7. Método según la reivindicación 6, en el que la centrifugación se realiza durante de 5 a 30 minutos a de 5000 a 10000 rpm.
8. Método según la reivindicación 6 ó 7, en el que la etapa de centrifugación se realiza en dos fases.
9. Método según la reivindicación 8, en el que la segunda etapa de centrifugación es una etapa de ultracentrifugación realizada durante de 30 a 120 minutos a de 30000 a 45000 rpm, originando así una fracción exosómica total.
10. Método según la reivindicación 6, en el que la etapa de microfiltración usa un microfiltro de hasta 0,22 micrómetros, originando así una muestra de orina descelularizada.
11. Método según la reivindicación 1, en el que el marcador de lesión renal aguda se seleccionan de NGAL, cistatina-3, KIM-1, IL-1beta, IL-18 o una combinación de los mismos.
12. Método según la reivindicación 1, en el que se realiza la detección mediante reacción inmunitaria con anticuerpos primarios contra NGAL, cistatina-3, KIM-1, IL-1beta, IL-18.

13. Método según la reivindicación 12, en el que los anticuerpos primarios están marcados.
14. Método según la reivindicación 1, en el que se realiza la detección detectando un anticuerpo secundario marcado dirigido contra los anticuerpos primarios dirigidos contra NGAL, cistatina-3, KIM-1, IL-1beta, IL-18.
15. Método según las reivindicaciones 12 ó 13, en el que el marcador de anticuerpo se selecciona de una enzima, un compuesto fluorescente, un compuesto infrarrojo, un compuesto radiactivo, un compuesto químico.
16. Método según la reivindicación 15, que incluye además una etapa para evaluar la lesión renal aguda en un sujeto para la monitorización, el diagnóstico, el pronóstico y/o la determinación de un tratamiento en el sujeto basándose en la presencia y/o el nivel del marcador de lesión renal específico.
17. Kit para la evaluación de lesión renal aguda en una fase temprana que comprende:
 - (a) medios para enriquecer una muestra de orina en exosomas usando al menos una etapa de inmunopurificación;
 - (b) medios para detectar un marcador de lesión renal aguda (LRA).
18. Kit según la reivindicación 17, que comprende además (c) medios para obtener una muestra de orina.
19. Kit según la reivindicación 17, en el que los anticuerpos para la etapa de inmunopurificación se seleccionan de anti-acuaporina 1 (anti-AQP1), anti-

acuaporina 2 (anti-AQP2) y anti-acuaporina 3 (anti-AQP3), anti-NKCC2, anti-NHE-3, anti-NaPiII o una combinación de los mismos.

20. Kit según la reivindicación 19, en el que los anticuerpos para la etapa de inmunopurificación están dirigidos contra cualquier dominio de acuaporina 1 (AQP1), acuaporina 2 (AQP2), acuaporina 3 (AQP3), NKCC2, NHE-3 y NaPiII.
21. Kit según la reivindicación 20, en el que el enriquecimiento de la muestra de orina en exosomas incluye al menos un medio adicional para el enriquecimiento de exosomas, antes de la inmunopurificación.
22. Kit según la reivindicación 21, en el que los medios para enriquecer la muestra de orina en exosomas se seleccionan de receptores, tubos de laboratorio, tubos de centrifuga, anticuerpos, tampón de reacción inmunitaria, disoluciones o agentes de bloqueo, disoluciones madre de los marcadores de lesión renal específicos, microfiltros, placa de 96 pocillos cubierta con los anticuerpos, o una combinación de los mismos.
23. Kit según la reivindicación 17, en el que los medios para detectar el marcador de lesión renal aguda son anticuerpos seleccionados de anticuerpos contra NGAL, cistatina-3, KIM-1, IL-1beta, IL-18 o una combinación de los mismos.
24. Kit según la reivindicación 23, en el que los anticuerpos están marcados.
25. Kit según la reivindicación 23, que comprende además un anticuerpo secundario marcado dirigido contra los anticuerpos primarios dirigidos

contra NGAL, cistatina-3, KIM-1, IL-1beta, IL-18, o una combinación de los mismos.

26. Kit según la reivindicación 24 o 25, en el que el marcador en los anticuerpos se selecciona de una enzima, un compuesto fluorescente, un compuesto infrarrojo, un compuesto radiactivo, un compuesto químico.
27. Kit según la reivindicación 26, en el que el kit incluye además instrucciones de uso del kit.
28. Método para purificar exosomas de orina, comprendiendo el método las siguientes etapas:
 - (a) incubar una muestra de orina, u opcionalmente, una muestra de orina descelularizada con un anticuerpo dirigido contra el dominio intracelular, extracelular o cualquier dominio de proteínas expresadas preferiblemente y de manera diferencial en la superficie de diferentes estructuras renales, formando así un complejo exosoma-anticuerpo;
 - (b) incubar el complejo exosoma-anticuerpo que resulta de (a) con una etiqueta que reconoce cualquier región del anticuerpo y se une a un agente insoluble, formando así un complejo exosoma-anticuerpo-etiqueta-agente insoluble;
 - (c) separar el complejo exosoma-anticuerpo-etiqueta-agente insoluble del sobrenadante;
 - (d) lavar el complejo exosoma-anticuerpo-etiqueta-agente insoluble con un tampón adecuado.
29. Método según la reivindicación 28, en el que los anticuerpos se seleccionan de anti-acuaporina 1 (anti-AQP1), anti-acuaporina 2 (anti-AQP2) y anti-acuaporina 3 (anti-AQP3), anti-NKCC2, anti-NHE-3, anti-NaPiII o una combinación de los mismos.

30. Método según la reivindicación 29, en el que los anticuerpos están dirigidos contra cualquier dominio de acuaporina 1 (AQP1), acuaporina 2 (AQP2), acuaporina 3 (AQP3), NKCC2, NHE-3 y NaPiII.
31. Uso de un anticuerpo o una combinación de anticuerpos dirigidos contra el dominio intracelular, extracelular o cualquier dominio de proteínas expresadas preferiblemente y de manera diferencial en la superficie de diferentes estructuras renales, en el que dichos anticuerpos son para la inmunopurificación de exosomas de orina.
32. Uso de un anticuerpo o una combinación de anticuerpos seleccionados de anti-acuaporina 1 (anti-AQP1), anti-acuaporina 2 (anti-AQP2) y anti-acuaporina 3 (anti-AQP3), anti-NKCC2, anti-NHE-3, anti-NaPiII o una combinación de los mismos, en el que dichos anticuerpos son para la inmunopurificación de exosomas de orina.
33. Uso de un anticuerpo o una combinación de anticuerpos dirigidos contra cualquier dominio de acuaporina 1 (AQP1), acuaporina 2 (AQP2), acuaporina 3 (AQP3), NKCC2, NHE-3 y NaPiII, en el que dichos anticuerpos son para la inmunopurificación de exosomas de orina.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: M&B PROPIEDAD INTELECTUAL E
INDUSTRIAL LTDA.
AV. ISIDORA GOYENECHEA 3477
PISO 19
LAS CONDES
7550106 SANTIAGO
CHILE

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year)

14 MAY 2012

Applicant's or agent's file reference
PS-8143-121

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/IB 11/54187

International filing date (day/month/year)

22 September 2011 (22.09.2011)

Priority date (day/month/year)

22 September 2011 (22.09.2011)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(8) - G01N 33/00, A61K 38/00; C12Q 1/00 (2012.01)

USPC - 435/7.92

Applicant UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1 bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Date of completion of this opinion

23 April 2012 (23.04.2012)

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITYInternational application No.
PCT/IB 11/54187

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:
- ☒ the international application in the language in which it was filed.
- ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a))
3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☐ in electronic form
- b. (time)
- ☐ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/IB 11/54187

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-33	YES
	Claims	none	NO
Inventive step (IS)	Claims	None	YES
	Claims	1-33	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-33	YES
	Claims	None	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-2 and 17-18 lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 2009/0258379 A1 to Klein et al. (hereinafter 'Klein') in view of US 2004/0241176 A1 to Lamparski (hereinafter 'Lamparski').

Regarding claim 1, Klein teaches a method for monitoring, diagnosis and/or prognosis of acute kidney injury in early stage and determination of treatment in subjects suffering thereof (para [0011]-[0012]), the method comprising the following steps:

(a) providing a urine sample (para [0012]);
 (b) enriching the urine sample in exosomes present in the urine sample (para [0011]-[0013]);
 (c) detecting and/or quantifying an acute kidney injury (AKI) marker in the exosomes (para [0011]-[0013]), but does not specifically teach using at least one step of immunopurification. Lamparski teaches a method of phenotyping exosomes comprising an initial step of binding the exosomes onto solid supports, such as beads. Even more preferably, the exosomes are covalently attached to solid supports such as beads, or through antibody-mediated affinity binding (para [0251]-[0256]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art, at the time the invention was made, to have applied the method of enriching/purifying exosome population using antibody-mediated affinity binding of Lamparski to the method of enriching exosome from a urine sample of Klein, and thus to have obtained an immunoaffinity-purified urinary exosome population, because Lamparski teaches that immunoaffinity-purified exosome population is suitable for analyzing disease biomarkers presented in said exosomes.

Regarding claim 2, Lamparski further teaches a method according to claim 1, wherein the immunopurification step is performed with antibodies directed to the intracellular, extracellular, or any domain of proteins preferably and differentially expressed in the surface of different kidney structures (para [0256]).

Regarding claim 17, Klein teaches a kit for evaluation of acute kidney injury in an early stage (para [0011]-[0012], [0066]) comprising:
 (a) means for enriching a urine sample in exosomes (para [0011]-[0013]);
 (b) means for detecting an acute kidney injury (AKI) marker (para [0011]-[0013]), but does not specifically teach using at least one step of immunopurification. Lamparski teaches a method of phenotyping exosomes comprising an initial step of binding the exosomes onto solid supports, such as beads. Even more preferably, the exosomes are covalently attached to solid supports such as beads, or through antibody-mediated affinity binding (para [0251]-[0256]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art, at the time the invention was made, to have applied the method of enriching/purifying exosome population using antibody-mediated affinity binding of Lamparski to the method of enriching exosome from a urine sample of Klein, and thus to have obtained an immunoaffinity-purified urinary exosome population, because Lamparski teaches that immunoaffinity-purified exosome population is suitable for analyzing disease biomarkers presented in said exosomes.

Regarding claim 18, Klein further teaches a kit according to claim 17, further comprising (c) means for obtaining a urine sample (para [0012]).

Claim 28 lacks inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Lamparski and Klein, as applied above..

Regarding claim 28, Lamparski teaches a method for purifying exosomes (para [0251]-[0256]), the method comprising the following steps:
 (a) Incubating a sample, with an antibody directed to the intracellular, extracellular, or any domain of proteins, thus forming an exosome-antibody complex (para [0255]-[0256]);
 (b) Incubating the exosome-antibody complex resulting from (a) with a tag that recognizes any region of the antibody and is bound to an insoluble agent, thus forming an exosome-antibody-tag-insoluble agent complex (para [0260]); however Lamparski fails to teach purifying urine exosomes wherein the antibodies used are preferably and differentially expressed in the surface of different kidney structure; (c) Separating the exosome-antibody-tag-insoluble agent complex from the supernatant; and (d) Washing of the exosome-antibody-tag-insoluble agent complex with an adequate buffer.

Klein teaches a method for purifying and phenotyping urinary exosomes as biomarkers for acute kidney injury (para [0011]-[0013]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art, at the time the invention was made, to have applied the immunopurification method of Lamparski to the method of Klein, because Lamparski teaches that immunoaffinity-purified exosome population is suitable for analyzing disease biomarkers presented in said exosomes. Although not specifically taught, the method of steps (c) and (d) are routinely conducted in the process of immunoaffinity purification and are well known to those of ordinary skill in the art and would have been obvious at the time of the invention.

*****Continued in Supplemental Box*****

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/IB 11/54187

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
Box V(2):

Claims 3-10, 19-22 and 29-33 lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Klein and Lamparski, as applied above, further in view of the journal article entitled "Decreased abundance of urinary exosomal aquaporin-1 in renal ischemia-reperfusion injury" by Sonoda et al. (hereinafter "Sonoda").

Regarding claim 3, Klein and Lamparski teach a method according to claim 2, however fail to teach wherein the antibodies for the immunopurification step are selected among anti-aquaporin1 (anti-AQP1), anti-aquaporin2 (anti-AQP2), and anti-aquaporin3 (anti-AQP3), anti-NKCC2, anti-NHE-3, anti-NaPiII or a combination thereof. Sonoda teaches wherein aquaporin-1 is a novel urinary biomarker for renal injury (page 1006, col 1, para 1) and further teaches identifying aquaporin1 with anti-AQP1 (page 1006, col 2, para 5). In light of the fact that Sonoda teaches wherein AQP1 is a novel renal injury marker it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to utilize anti-AQP1 antibodies to identify AQP1 in the urine samples taught by Klein and Lamparski in order to identify renal failure.

Regarding claim 4, the combination of Klein, Lamparski and Sonoda makes obvious the method according to claim 3, and Sonoda further teaches wherein the antibodies for the immunopurification step are directed to any domain of aquaporin1 (AQP1) (page 1006, col 2, para 5).

Regarding claim 5, the combination of Klein, Lamparski and Sonoda makes obvious the method according to claim 4, and Klein further teaches wherein the enrichment of the urine sample in exosomes include at least one further mean for enrichment of exosomes, previous to the immunopurification (para [0095], [0097]).

Regarding claim 6, the combination of Klein, Lamparski and Sonoda makes obvious the method according to claim 5, and Klein further teaches wherein the further mean for enrichment of the urine sample in exosomes is a centrifugation step thus originating a decellularized urine sample (para [0012]).

Regarding claim 7, the combination of Klein, Lamparski and Sonoda makes obvious the method according to claim 6, however fails to teach wherein the centrifugation is performed for 5 to 30 minutes at 5000 to 10000 rpm. Although neither Klein, Lamparski or Sonoda teaches centrifugation performed for 5 to 30 minutes at 5000 to 10000 rpm, optimization of effective parameters is routine for a person of ordinary skill in the art. It would have been customary for an artisan of ordinary skill to determine the optimal speed and duration of centrifugation to achieve the desired results. Thus, absent some demonstration of unexpected results from the claimed parameters, the optimization of centrifugation would have been obvious at the time of the applicant's invention.

Regarding claim 8, the combination of Klein, Lamparski and Sonoda makes obvious the method according to claim 6 and 7, and Klein further teaches wherein the centrifugation step is performed in two stages (para [0012], [0077]).

Regarding claim 9, the combination of Klein, Lamparski and Sonoda makes obvious the method according to claim 8, and Klein further teaches wherein the second centrifugation step is an ultracentrifugation step (para [0077]), however fails to teach wherein the ultracentrifugation step is performed for 30 to 120 minutes at 30000 to 45000 rpm, thus originating a total exosomal fraction. Although neither Klein, Lamparski or Sonoda teaches centrifugation performed for 30 to 120 minutes at 30000 to 45000 rpm, optimization of effective parameters is routine for a person of ordinary skill in the art. It would have been customary for an artisan of ordinary skill to determine the optimal speed and duration of centrifugation to achieve the desired results. Thus, absent some demonstration of unexpected results from the claimed parameters, the optimization of centrifugation would have been obvious at the time of the applicant's invention.

Regarding claim 10, the combination of Klein, Lamparski and Sonoda makes obvious a method according to claim 6, however fails to teach wherein the microfiltration step uses a microfilter up to 0.22 micrometers, thus originating a decellularized urine sample. Although the size of the microfilter is not specified by Klein (para [0098]) it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to determine through routine experimentation the optimal parameters of the method and is routine for a person of ordinary skill in the art. Thus, absent some demonstration of unexpected results from the claimed parameters, the optimization of the microfilter would have been obvious at the time of the applicant's invention.

Regarding claim 19, Klein and Lamparski teaches a kit according to claim 17, however fails to teach wherein the antibodies the antibodies for the immunopurification step are selected among anti-aquaporin1 (anti-AQP1), anti-aquaporin2 (anti-AQP2), and anti-aquaporin3 (anti-AQP3), anti-NKCC2, anti-NHE-3, anti-NaPiII or a combination thereof. Sonoda teaches wherein aquaporin-1 is a novel urinary biomarker for renal injury (page 1006, col 1, para 1) and further teaches identifying aquaporin1 with anti-AQP1 (page 1006, col 2, para 5). In light of the fact that Sonoda teaches wherein AQP1 is a novel renal injury marker it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to utilize anti-AQP1 antibodies to identify AQP1 in the urine samples taught by Klein in order to identify renal failure.

Regarding claim 20, the combination of Klein, Lamparski and Sonoda teaches a kit according to claim 19, and Sonoda further teaches wherein the antibodies for the immunopurification step are directed to any domain of aquaporin1 (AQP1) (page 1006, col 2, para 5).

Regarding claim 21, the combination of Klein, Lamparski and Sonoda teaches a kit according to claim 20, and Klein further teaches wherein the enrichment of the urine sample in exosomes include at least one further mean for enrichment of exosomes, previous to the immunopurification (para [0095], [0097]).

*****Continued in Supplemental Box*****

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/IB 11/54187

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
Box V(2):

Regarding claim 22, the combination of Klein, Lamparski and Sonoda teaches a kit according to claim 21, wherein the means for enriching the urine sample in exosomes includes laboratory tubes (para [0076]).

Regarding claim 29, Lamparski and Klein make obvious a method according to claim 28, however fail to teach wherein the antibodies are selected among anti-aquaporin1 (anti-AQP1), anti-aquaporin2 (anti-AQP2), and anti-aquaporin3 (anti-AQP3), anti-NKCC2, anti-NHE-3, anti-NaPi or a combination thereof. Sonoda teaches wherein aquaporin-1 is a novel urinary biomarker for renal injury (page 1006, col 1, para 1) and further teaches identifying aquaporin1 with anti-AQP1 (page 1006, col 2, para 5). In light of the fact that Sonoda teaches wherein AQP1 is a novel renal injury marker it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to utilize anti-AQP1 antibodies to identify AQP1 in the urine samples taught by Klein in order to identify renal failure.

Regarding claim 30, the combination of Lamparski, Klein and Sonoda makes obvious a method according to claim 29, and Sonoda further teaches wherein the antibodies for the immunopurification step are directed to any domain of aquaporin1 (AQP1) (page 1006, col 2, para 5).

Regarding claims 31-33, concerning the use of an antibody or a combination of antibodies selected among anti-aquaporin1 (antiAQP1), anti-aquaporin2 (anti-AQP2), and anti aquaporin3 (anti-AQP3), anti-NKCC2, anti-NHE-3, anti-NaPi or a combination thereof, wherein said antibodies are for immunopurification of urinary exosomes, Lamparski teaches the use of antibodies for immunopurification of exosomes (para [0251]-[0256]). Klein teaches a method of purifying urinary exosomes (para [0011]-[0013]) however fails to teach wherein the antibodies are selected among anti-aquaporin1 (antiAQP1), anti-aquaporin2 (anti-AQP2), and anti aquaporin3 (anti-AQP3), anti-NKCC2, anti-NHE-3, anti-NaPi. Sonoda teaches wherein aquaporin-1 is a novel urinary biomarker for renal injury (page 1006, col 1, para 1) and further teaches identifying aquaporin1 with anti-AQP1 (page 1006, col 2, para 5). In light of the fact that Sonoda teaches wherein AQP1 is a novel renal injury marker it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to utilize anti-AQP1 antibodies to identify AQP1 in the urine samples taught by Lamparski and Klein in order to identify renal failure.

Claims 11-16 and 23-27 lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Klein and Lamparski, as applied above, in view of US 2010/0116662 A1 to Ali et al. (hereinafter 'Ali').

Regarding claim 11, Klein and Lamparski teach a method according to claim 1, however fail to teach wherein the acute kidney injury marker are selected among NGAL, Cystatin-3, KIM-I, IL-1 β , IL-18 or a combination thereof. Ali teaches wherein NGAL is a marker of kidney injury (para [0013]) and therefore it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to utilize NGAL as a marker in the method taught by Klein.

Regarding claim 12, Klein and Lamparski teach a method according to claim 1, and further teach wherein detection is performed by immune reaction with primary antibodies (para [0062]), however fails to teach wherein the antibodies are against NGAL, Cystatin-3, KIM-I, IL-1 β , IL-18. Ali teaches wherein NGAL is a marker of kidney injury (para [0013]) and further teaches antibodies against NGAL (para [0138]) and therefore it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to utilize NGAL as a marker in the method taught by Klein.

Regarding claim 13, the combination of Klein, Lamparski and Ali makes obvious a method according to claim 12, and Ali further teaches wherein the primary antibodies are labeled (para [0153]).

Regarding claim 14, the combination of Klein, Lamparski and Ali makes obvious a method according to claim 1, and Ali further teaches wherein the detection is performed by detecting a labeled secondary antibody directed against the primary antibodies directed against NGAL (para [0153]).

Regarding claim 15, the combination of Klein, Lamparski and Ali makes obvious a method according to claims 12, and Ali further teaches wherein the antibody label is an enzyme (para [0153]).

Regarding claim 16, the combination of Klein and Ali makes obvious a method according to claim 15, and Klein further teaches the method further including a step for evaluating the acute kidney injury in a subject for monitoring, diagnosis, prognosis and/or determining a treatment in the subject based on the presence and/or level of the specific kidney injury marker (para [0011]-[0012]).

Regarding claim 23, Klein and Lamparski teach the kit according to claim 17, however fail to teach wherein the means for detecting the acute kidney injury marker are antibodies selected among antibodies against NGAL, Cystatin-3, KIM-I, IL1 β , IL-18 or a combination thereof. Ali teaches wherein NGAL is a marker of kidney injury (para [0013]) and therefore it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to utilize NGAL as a marker in the method taught by Klein.

Regarding claim 24, the combination of Klein, Lamparski and Ali makes obvious a kit according to claim 23, and Ali further teaches wherein the primary antibodies are labeled (para [0153]).

Regarding claim 25, the combination of Klein, Lamparski and Ali makes obvious a kit according to claim 23, and Ali further teaches wherein the detection is performed by detecting a labeled secondary antibody directed against the primary antibodies directed against NGAL (para [0153]).

Regarding claim 26, the combination of Klein, Lamparski and Ali makes obvious a kit according to claim 24, and Ali further teaches wherein the antibody label is an enzyme (para [0153]).

*****Continued in Supplemental Box*****

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITYInternational application No.
PCT/IB 11/54187

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
Box V(2):

Regarding claim 27, the combination of Klein, Lamparski and Ali makes obvious a kit according to claim 26, and Klein further teaches wherein the kit further includes instructions for using the kit (para [0066]).

Claims 1-33 have industrial applicability under PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 31-03-14	
(51) Clasificación Internacional: G01N 33/00	
(71) Solicitante(s): UNIVERSIDAD DE LOS ANDES	
(72) Inventor(es): IRARRAZABAL MUÑOZ, Carlos Ernesto.	
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 22-04-14	(87) Publicación internacional
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT	Fecha: 28-03-13
Fecha de presentación de la solicitud: 22-09-11	No. Publicación: WO 2013/041913 A1
No. de solicitud: PCT/IB2011/054187	
(54) Título: MÉTODO PARA LA MONITORIZACIÓN, EL DIAGNÓSTICO Y/O EL PRONÓSTICO DE LESIÓN RENAL AGUDA EN FASE TEMPRANA.	
(57) Resumen:	
Resumen.-	
La presente invención se refiere a un método y un kit para la monitorización, el diagnóstico, el pronóstico de lesión renal aguda en fase temprana y la determinación del tratamiento en sujetos que padecen la misma. El método comprende las etapas de a) proporcionar una muestra de orina; b) enriquecer la muestra de orina en exosomas presentes en la muestra de orina usando al menos una etapa de inmunopurificación; c) detectar un marcador de lesión renal aguda (LRA) en el exosoma.	
Sector: Composiciones que contienen péptidos y procesos de medida, investigación o análisis que los comprenden.	

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 31-03-14	
(51) Clasificación Internacional: G01N 33/00	
(71) Solicitante(s): UNIVERSIDAD DE LOS ANDES	
(72) Inventor(es): IRARRAZABAL MUÑOZ, Carlos Ernesto.	
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 22-04-14	(87) Publicación internacional
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha: 28-03-13
Fecha de presentación de la solicitud: 22-09-11	No. publicación: WO 2013/041913 A1
No. de solicitud: PCT/IB2011/054187	
(54) Título: MÉTODO PARA LA MONITORIZACIÓN, EL DIAGNÓSTICO Y/O EL PRONÓSTICO DE LESIÓN RENAL AGUDA EN FASE TEMPRANA.	

 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 31-03-14 (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País	(51) Int Cl: G01N 33/00 (71) Solicitante(s): UNIVERSIDAD DE LOS ANDES (72) Inventor(es): IRARRAZABAL MUÑOZ, Carlos Ernesto. (74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 22-04-14 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 22-09-11 No. de solicitud: PCT/IB2011/054187	(87) Publicación internacional Fecha: 28-03-13 No. publicación: WO 2013/041913 A1
(54) Título: “MÉTODO PARA LA MONITORIZACIÓN, EL DIAGNÓSTICO Y/O EL PRONÓSTICO DE LESIÓN RENAL AGUDA EN FASE TEMPRANA”	

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

La presente invención se refiere a un método y un kit para la monitorización, el diagnóstico, el pronóstico de lesión renal aguda en fase temprana y la determinación del tratamiento en sujetos que padecen la misma. El método comprende las etapas de a) proporcionar una muestra de orina; b) enriquecer la muestra de orina en exosomas presentes en la muestra de orina usando al menos una etapa de inmunopurificación; c) detectar un marcador de lesión renal aguda (LRA) en el exosoma.

Sector: Composiciones que contienen péptidos y procesos de medida, investigación o análisis que los comprenden.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PS-8143-121	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB 11/54187	International filing date (<i>day/month/year</i>) 22 September 2011 (22.09.2011)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 22 September 2011 (22.09.2011)
Applicant UNIVERSIDAD DE LOS ANDES		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant.
☒ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant.
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB 11/54187

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

The present invention relates to a method and a kit for monitoring, diagnosis, prognosis of acute kidney injury in early stage and determination of treatment in subjects suffering thereof. The method comprises the steps of a) providing a urine sample; b) enriching the urine sample in exosomes present in the urine sample using at least one step of immunopurification; c) detecting an acute kidney injury (AKI) marker in the exosome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB 11/54187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - G01N 33/00, A61K 38/00; C12Q 1/00 (2012.01)

USPC - 435/7.92

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8): G01N 33/00, A61K 38/00; C12Q 1/00 (2012.01)

USPC: 435/7.92

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

USPC: 530/344, 435/4

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubWEST, Google Scholar: Urin\$4, exosome\$2, incubat\$4, antibod\$4, tag\$2, insoluble\$2, supernatant\$2, AQP1, AQP2, AQP3, NIKCC2, NHE-3, NaPiII, immunopurification, purif\$4, monitor, diagnosis, prognosis, kidney injury, marker, antibody

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2009/0258379 A1 (KLEIN et al.) 15 October 2009 (15.10.2009); para [0011]-[0013], [0061], [0062], [0066], [0077], [0085], [0093], [0098]	1-33
Y	US 2004/0241176 A1 (Lamparski et al.) 02 December 2004 (02.12.2004) para [0251]-[0256], [0260]	1-33
Y	Decreased abundance of urinary exosomal aquaporin-1 in renal ischemia-reperfusion injury. SONODA et al., American Journal physiol Renal Physiol, 29 July 2009, Vol. 297, pages F1006-F1016; page 1006, col 1, para 1; page 1006, col 2, para 5	3-10, 19-22, 29-33
Y	US 2010/0116662 A1 (ALI et al.) 13 May 2010 (13.05.2010); para [0013], [0138]	11-16, 23-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 April 2012 (23.04.2012)

Date of mailing of the international search report

14 MAY 2012

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

MORALES & BESA

A B O G A D O S

MARIA GLORIA ACHARAN TOLEDO
NOTARIA 42 - A. M.
NOTARIO - SANTIAGO

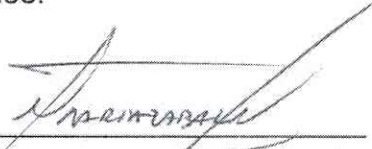
CESIÓN

En la ciudad de Santiago a 21 de Septiembre de 2011 el abajo firmante, don **CARLOS ERNESTO IRARRAZABAL MUÑOZ**, RUT N° **8.256.894-6**, con domicilio en Jorge González Bastias 3997, Macul, Santiago, Chile, Cede, vende o transfiere a **UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**, RUT **71.614.000-8**, con domicilio en San Carlos de Apoquindo 2200, Las Condes, Santiago, Chile, Todos los derechos, intereses privilegios en la invención cuyo título es **METHOD FOR MONITORING, DIAGNOSIS, PROGNOSIS OF ACUTE KIDNEY INJURY IN EARLY STAGE**.

El precio de esta cesión es de US\$1 de cuya cantidad, por el documento presente, el cedente otorga el más amplio recibo y finiquito.

Por lo tanto, el cedente autoriza a las autoridades chilenas y extranjeras para registrar la presente cesión a favor de la cesionaria.

CEDENTE/ ASSIGNOR:


CARLOS ERNESTO IRARRAZABAL MUÑOZ

CESIONARIO/ ASSIGNEE:


UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
pp **ORLANDO ANTONIO POBLETE ITURRATE**


UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
pp **CARMEN LUZ VALENZUELA PERALTA**

ASSIGNMENT

In the city of Santiago on September 21th, 2011 the undersigned Mr. **CARLOS ERNESTO IRARRAZABAL MUÑOZ**, Tax Payer Number **8.256.894-6**,

With address at Jorge González Bastias 3997, Macul, Santiago, Chile, Assigns, sells or transfer to **UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**, Tax Payer Number **71.614.000-8**,

With address at San Carlos de Apoquindo 2200, Las Condes, Santiago, Chile,

All rights, titles and interests in the patent application which title is **METHOD FOR MONITORING, DIAGNOSIS, PROGNOSIS OF ACUTE KIDNEY INJURY IN EARLY STAGE**.

The consideration of this assignment is the amount of US\$1, receipt of which is acknowledged hereby.

Therefore, the assignors authorize the Chilean and foreign authorities to register the assignment on behalf the assignee.

MORALES & BESA

A B O G A D O S

MARIA GLORIA ACHARAN TOLEDO

NOTARIA 42 - A. M.

NOTARIO - SANTIAGO

MARIA GLORIA ACHARAN TOLEDO
NOTARIA 42 - A. M.
NOTARIO - SANTIAGO

La personería de don **ORLANDO ANTONIO POBLETE ITURRATE** y de doña **CARMEN LUZ VALENZUELA PERALTA** para actuar en representación de **UNIVERSIDAD DE LOS ANDES** consta en escritura pública de fecha 3 de Septiembre de 2010 otorgada en la Notaría Pública de Santiago de doña María Gloria Acharán Toledo.

ESTE DOCUMENTO DE CESIÓN
DEBE SER FIRMADO ANTE
NOTARIO PÚBLICO.

The capacity of Mr. **ORLANDO ANTONIO POBLETE ITURRATE** and Ms. **CARMEN LUZ VALENZUELA PERALTA** to act on behalf of **UNIVERSIDAD DE LOS ANDES** is stated in public deed dated September 3rd, 2010 executed in the Notary Public of Santiago from María Gloria Acharán Toledo.

THIS ASSIGNMENT DOCUMENT
MUST BE EXECUTED BEFORE
NOTARY PUBLIC.

FIRMO ANTE MI, DON CARLOS ERNESTO IRARRAZABAL MUÑOZ, C.I. 9.256.894-6 NACIONAL, COMO CEDENTE; DON ORLANDO VICTOR ANTONIO POBLETE ITURRATE, C.I. 6.949.187-1 NACIONAL, Y DOÑA CARMEN LUZ VALENZUELA PERALTA, C.I. 6.789.048-5 NACIONAL, AMBOS EN REPRESENTACION DE UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, COMO CESIONARIO.- SANTIAGO, 21 de Septiembre de 2011.-

SERGIO NOVOA GALAN
Notario Suplente
María Gloria Acharan Toledo
NOTARIA 42 - A.M.
NOTARIA - SANTIAGO



(51) International Patent Classification:

G01N 33/00 (2006.01) C12Q 1/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2011/054187

(22) International Filing Date:

22 September 2011 (22.09.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(71) Applicant (for all designated States except US): **UNIVERSIDAD DE LOS ANDES** [CL/CL]; San Carlos de Apoquindo 2200, Las Condes, Santiago, 91003910 (CL).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **IRARRAZABAL MUÑOZ, Carlos Ernesto** [CL/CL]; Jorge González Bastias 3997, Macul, Santiago, 7830238 (CL).

(74) Agent: **M&B PROPIEDAD INTELECTUAL E INDUSTRIAL LTDA.**; Av. Isidora Goyenechea 3477, Piso 19, Las Condes, Santiago, 7550106 (CL).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,

CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: METHOD FOR MONITORING, DIAGNOSIS AND/OR PROGNOSIS OF ACUTE KIDNEY INJURY IN EARLY STAGE

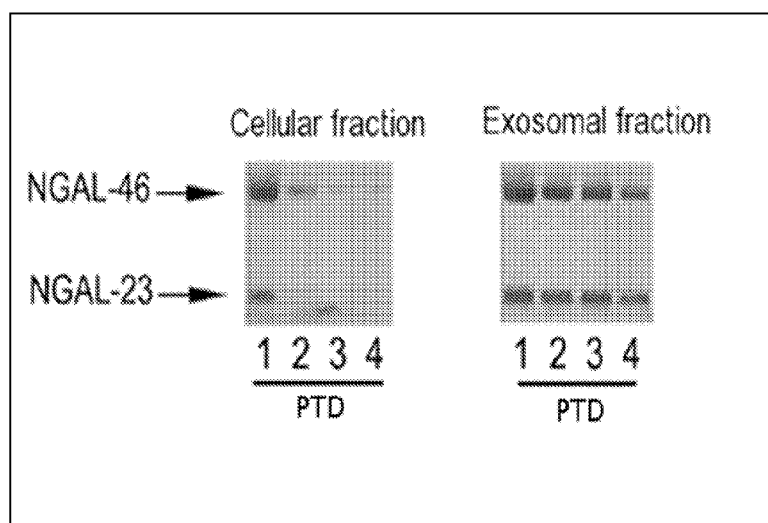


Figure 1

(57) Abstract: The present invention relates to a method and a kit for monitoring, diagnosis, prognosis of acute kidney injury in early stage and determination of treatment in subjects suffering thereof. The method comprises the steps of a) providing a urine sample; b) enriching the urine sample in exosomes present in the urine sample using at least one step of immunopurification; c) detecting an acute kidney injury (AKI) marker in the exosome.

MÉTODO PARA LA MONITORIZACIÓN, EL DIAGNÓSTICO Y/O EL PRONÓSTICO DE LESIÓN RENAL AGUDA EN FASE TEMPRANA

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método y un kit para la monitorización, el diagnóstico, el pronóstico de lesión renal aguda en fase temprana y la determinación del tratamiento en sujetos que padecen la misma. El método comprende las etapas de a) proporcionar una muestra de orina; b) enriquecer la muestra de orina en exosomas presentes en la muestra de orina usando al menos una etapa de inmunopurificación; c) detectar un marcador de lesión renal aguda (LRA) en el exosoma.

SECTOR: Composiciones que contienen péptidos y procesos de medida, investigación o análisis que los comprenden.

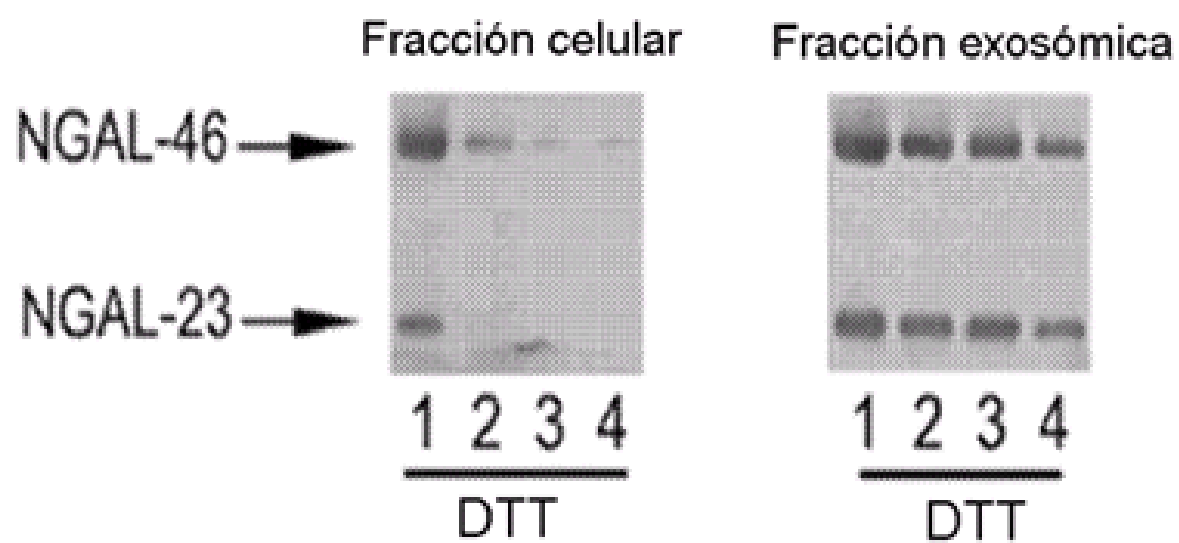


Figura 1

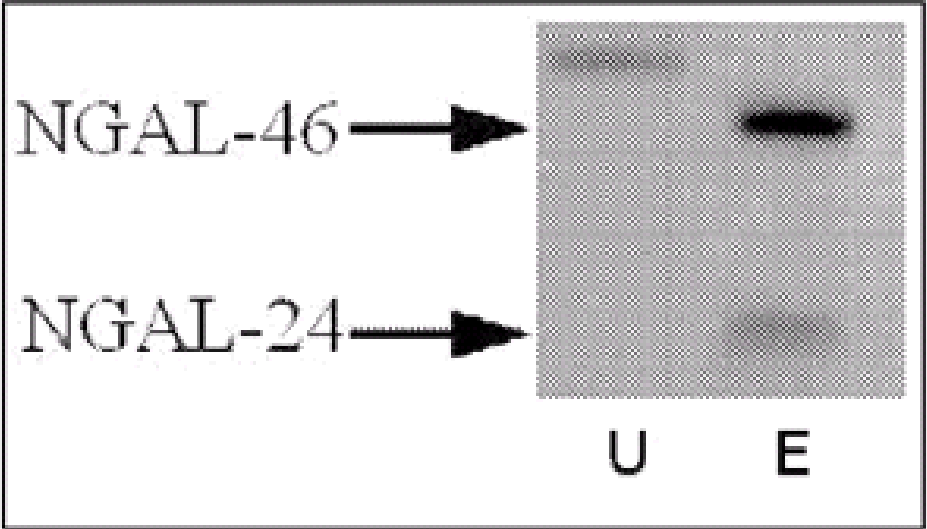


Figura 2

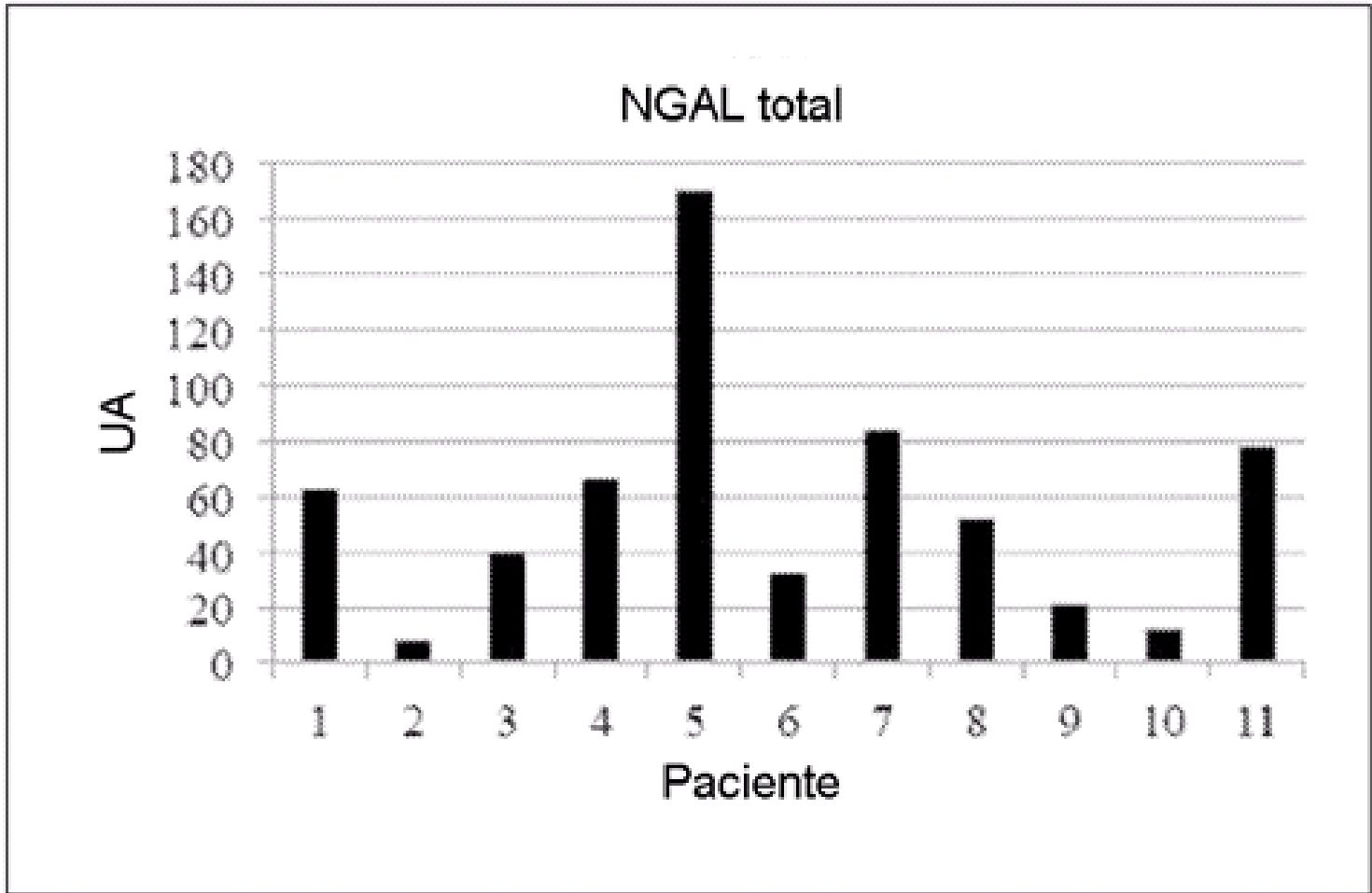


Figura 3

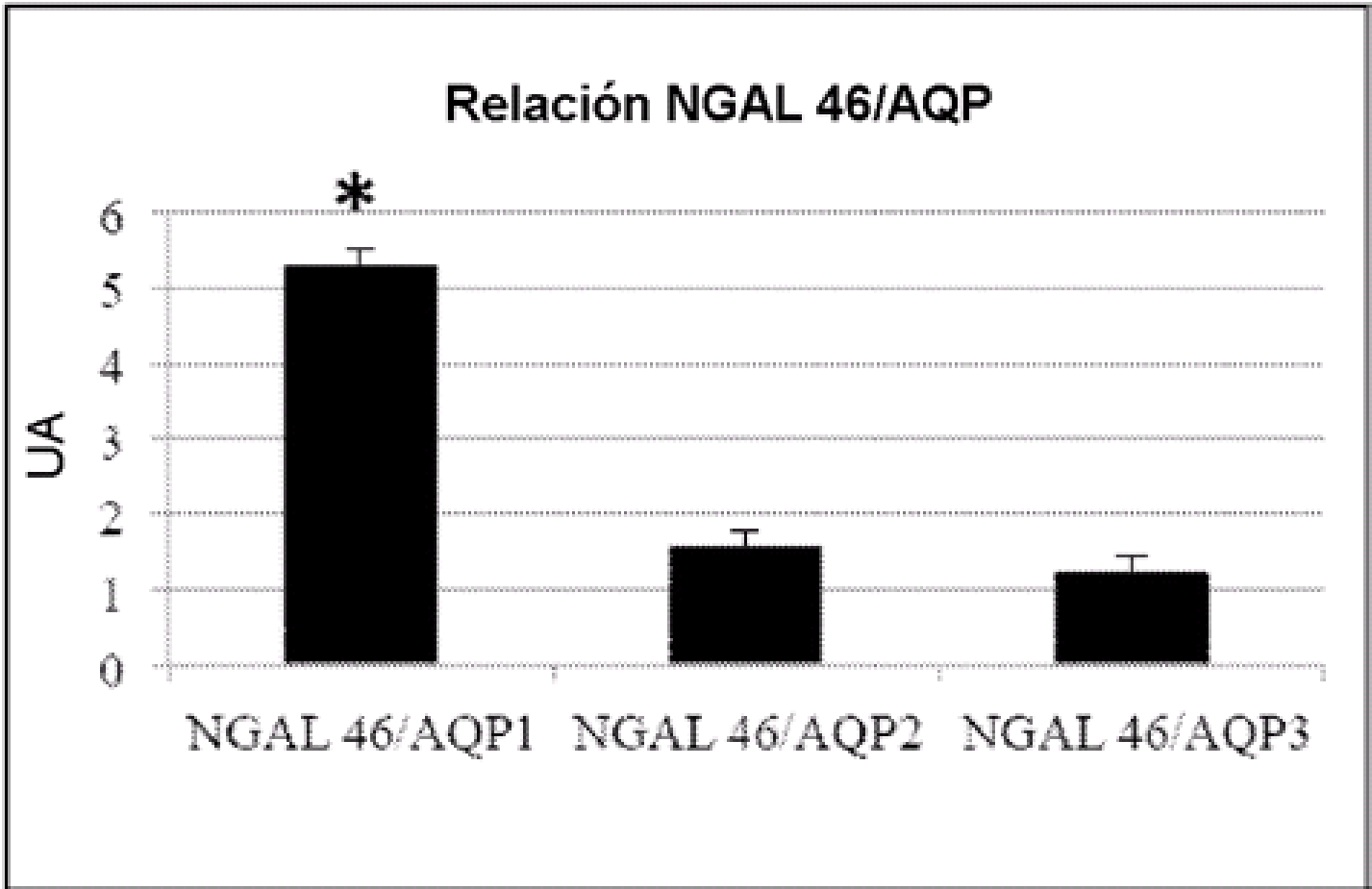


Figura 4

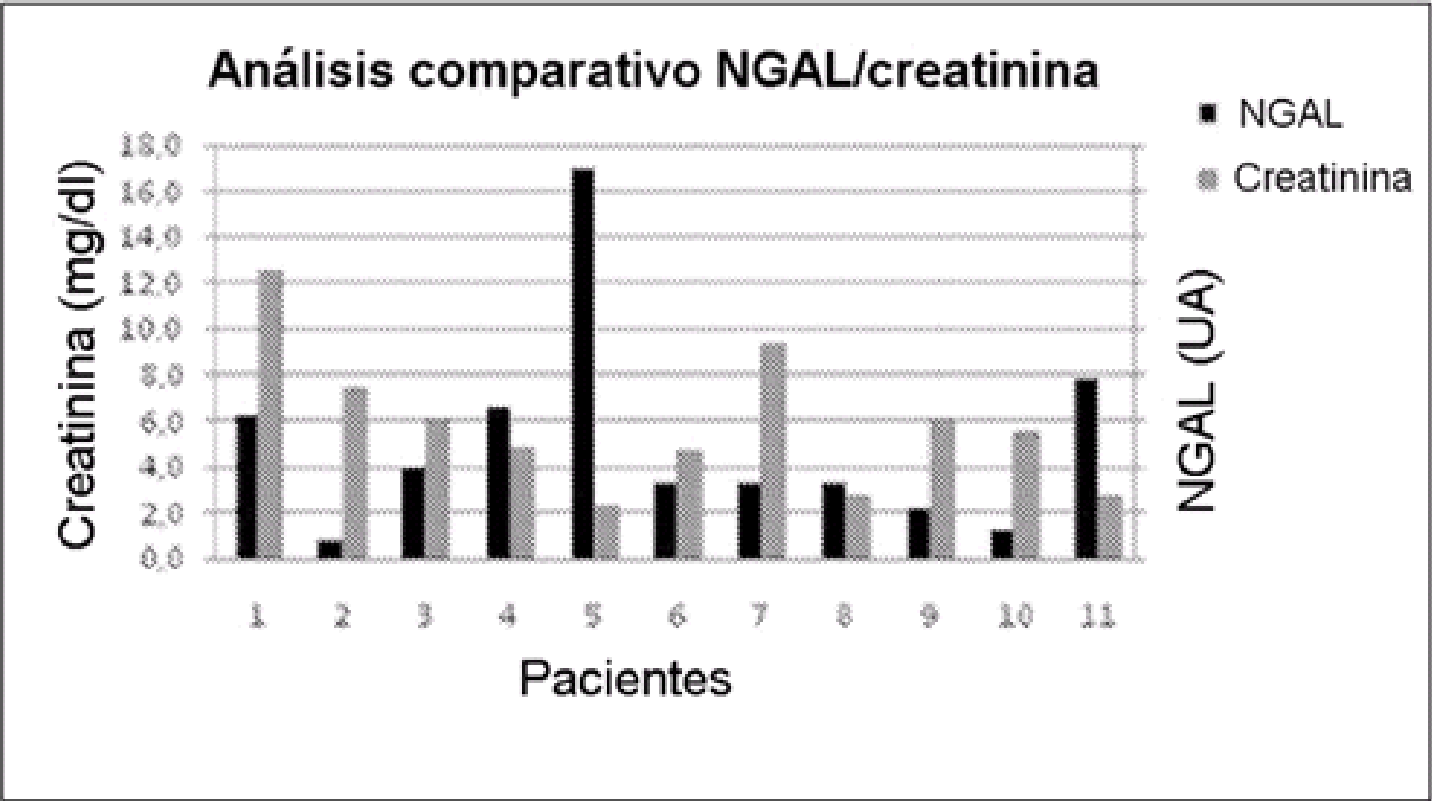


Figura 5

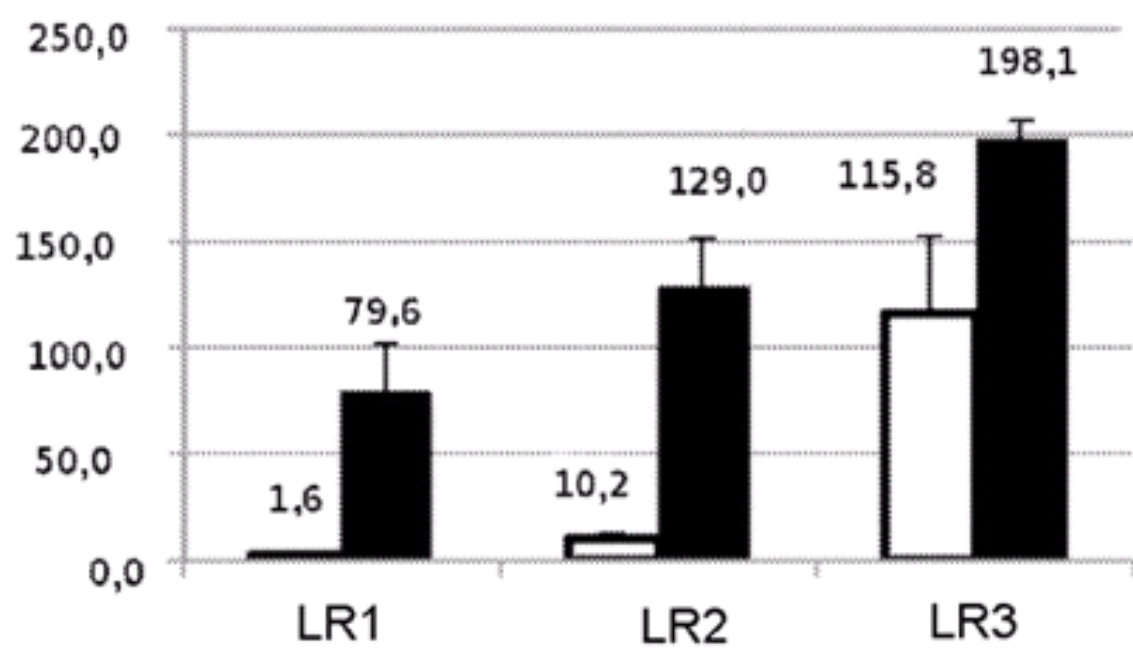


Figura 6

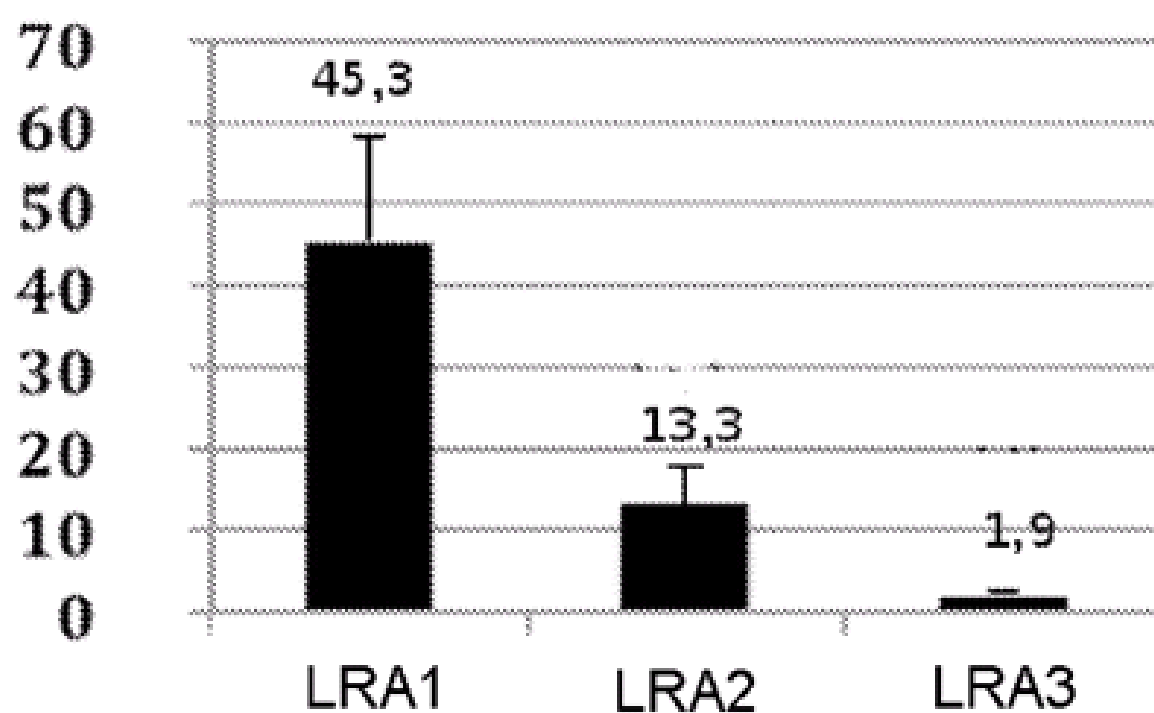


Figura 7

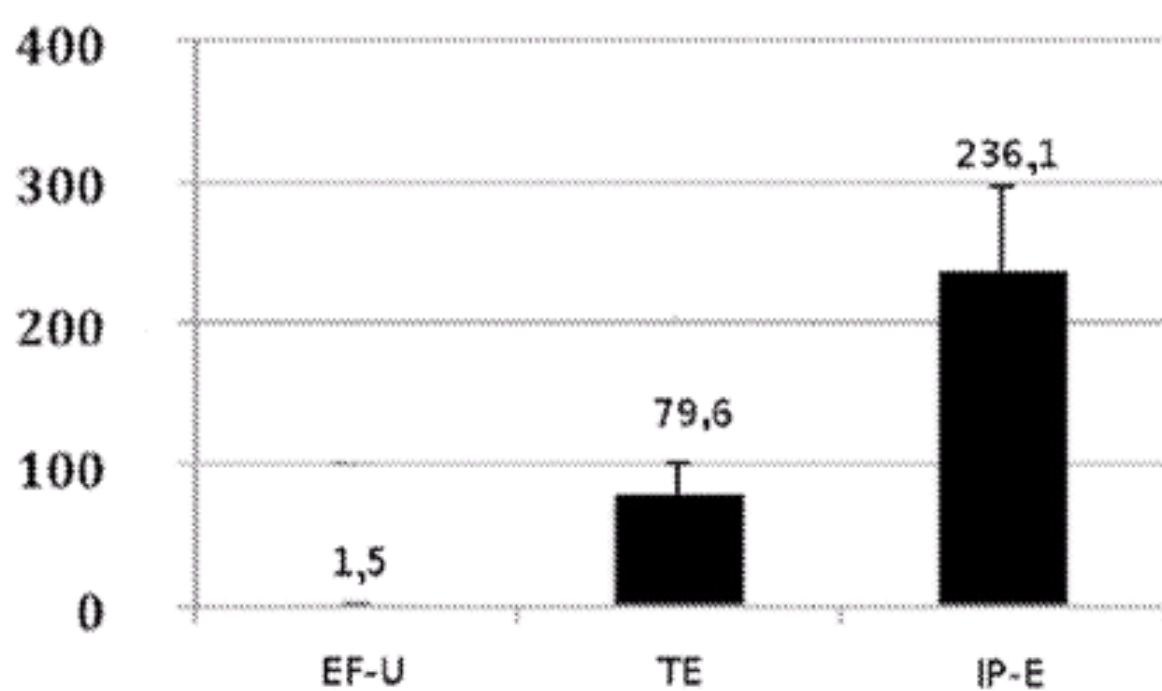


Figura 8