

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 363 661**

21 Número de solicitud: 200901825

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **04.09.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.2011**

Fecha de la concesión: **18.05.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **30.05.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**30.05.2012**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO  
RAMÓN Y CAJAL.  
CTRA. COLMENAR VIEJO - KM. 9,100  
28034 MADRID, ES**

72 Inventor/es:

**GARCÍA BERMEJO, MARÍA LAURA;  
AGUADO FRAILE, ELIA;  
LIAÑO GARCÍA, FERNANDO y  
SÁENZ MORALES, DAVID**

74 Agente/Representante:

**Temiño Ceniceros, Ignacio**

54 Título: **MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO Y/O PRONÓSTICO DE DAÑO RENAL AGUDO.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo mediante el análisis del nivel de expresión del micro-RNA miR-127.

ES 2 363 661 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo.

**Campo de la invención**

La presente invención se encuadra en general dentro del campo de la biomedicina y en particular se refiere a un método para el diagnóstico y/o pronóstico del daño renal agudo.

**Antecedentes de la invención**

En el trasplante renal, la Necrosis Tubular Aguda (NTA) es la causa fundamental del retraso en la función post-trasplante del injerto. Además, la NTA contribuye a una mayor incidencia del rechazo agudo, al desarrollo de rechazo crónico y a la disminución de la supervivencia del injerto (Pannu *et al.*, 2008). El incremento en la demanda de órganos en los últimos años conlleva el uso de órganos procedentes de donantes sub-óptimos, incluyendo donantes en asistolia y donantes afeosos, lo cual incrementa muy significativamente el porcentaje de desarrollo de NTA post-trasplante, la morbilidad del injerto y el retraso en su recuperación funcional. Todo ello dispara el coste económico total de un trasplante renal a la sanidad pública. Destacar que las últimas estadísticas de la ONT indican la realización en España de unos 2.200 trasplantes renales/año y más de 4.000 pacientes aún en lista de espera (Dominguez-Gil y Pascual, 2008). Por otro lado, la NTA es la manifestación morfológica más frecuente del Fracaso Renal Agudo (FRA), incluyendo el de origen isquémico (Kellum *et al.*, 2008). El FRA representa uno de los problemas más graves dentro de las enfermedades renales en el mundo desarrollado por la elevada mortalidad que conlleva, alrededor del 50%. En torno al 30% de todos los episodios de FRA ocurren en los enfermos ingresados en las UCIs, como consecuencia de un fallo multiorgánico. En este último contexto, la mortalidad se eleva al 80% (Chertow *et al.*, 2005). El desarrollo de FRA es además una de las complicaciones más habituales tras una intervención cardíaca, de las que se realizan unas 30.000/año en España y más de un 1% de ellas en nuestro Hospital. Prácticamente la totalidad de los pacientes intervenidos desarrollan cierto grado de FRA (Yates and Stafford-Schmit, 2006). De la gravedad de este FRA post-operatorio depende la evolución a largo plazo de los pacientes, resultando en una mortalidad cercana al 60% en aquellos casos que requieran diálisis tras la intervención cardíaca (Takar *et al.*, 2005; Candela-Toha *et al.*, 2008). Tanto la cirugía cardíaca como el trasplante renal son dos situaciones “cuasi” experimentales de estudio para la NTA en humanos, ya que se conoce el momento y la duración del estímulo isquémico y además se pueden monitorizar. Todas estas estadísticas de morbi-mortalidad no han variado significativamente en las últimas décadas y hasta el momento, no existe una terapéutica eficaz para la prevención y/o reducción de la NTA en todas estas situaciones. A ello ha contribuido en gran medida la falta de marcadores de daño renal más precisos que la determinación de creatinina y urea en suero, utilizados hasta el momento. Estos marcadores clásicos no reflejan directamente el daño celular ni en que compartimento del tejido renal (túbulo o endotelio) se está produciendo el mismo, tan sólo son parámetros indicativos de una función renal alterada consecuencia del daño (Vaidya *et al.*, 2008). De hecho, es posible que pacientes con un daño renal subclínico no sean iden-

tificados como tales porque no se haya producido una alteración significativa en los niveles séricos de creatinina y urea. Así, en los últimos años se están desarrollando numerosos estudios tratando de identificar y validar nuevos marcadores del FRA como NGAL, IL18, KIM, Cistatina C, VEGF o CXCL10, que parecen funcionar como buenos marcadores en poblaciones infantiles sin patologías añadidas significativas pero no en población adulta (Vaidya *et al.*, 2008).

La isquemia renal, la hipovolemia y los tóxicos son las causas más frecuentes de desarrollo de NTA. La reducción en el flujo de sangre y como consecuencia la hipoxia tisular causan daño a nivel del epitelio proximal tubular, provocan un rápido descenso del filtrado glomerular, alteran la permeabilidad vascular y desencadenan una respuesta inflamatoria que amplifica el daño tisular (Thurman *et al.*, 2007). El grado y la extensión del daño isquémico son dependientes de la severidad y la duración de la isquemia. En isquemias subletales, se observa el desprendimiento de las células del epitelio proximal, muchas de ellas viables, al lumen tubular. En isquemias más prolongadas, la persistente hipoxia tisular y la respuesta inflamatoria, entre otros, incrementan el daño epitelial y vascular, con muerte celular en la zona cortico-medular del riñón. Por otro lado, el compartimento vascular también se daña tras isquemia. De hecho, el daño endotelial contribuye muy significativamente al daño renal agudo y también al mantenimiento del mismo en el tiempo. Alteraciones tempranas en el flujo peritubular durante la isquemia y temprana reperusión se asocian a la pérdida de la morfología y función endoteliales contribuyendo a la pérdida de función de barrera, la inflamación y la actividad procoagulante. A medio-largo plazo, se ha descrito pérdida de la densidad microvascular que favorece la progresión del daño renal crónico como consecuencia directa de la isquemia inicial (Basile 2007). Para resolver la NTA, se ponen en marcha mecanismos que facilitan la reparación tisular: división y diferenciación celulares a partir de las células epiteliales tubulares no dañadas. En los últimos años varios trabajos han demostrado que a la reparación del daño tubular tras la isquemia pueden contribuir no sólo las propias células epiteliales no dañadas que se des-diferencian y proliferan, sino células pluripotenciales renales e incluso células pluripotenciales extrarrenales como las procedentes de médula ósea (Lin 2008). Sin embargo, la contribución de células progenitoras a la reparación del daño isquémico está puesta en duda, aunque sí se acepta que a ésta contribuirían fundamentalmente las células tubulares proximales no dañadas y la re-vascularización del parénquima. En este último proceso, se ha propuesto que también participarían progenitores endoteliales movilizados tras isquemia (Becherucci *et al.*, 2009).

Los miRNAs son RNAs de pequeño tamaño (22-25 nucleótidos) codificados endógenamente capaces de reconocer RNAs mensajeros y así regular negativamente la expresión de proteínas, dentro de complejos de silenciamiento inducido (RISC) por complementariedad total o parcial con su mRNA diana (Chang and Mendell, 2007). En humanos se han clonado ya más de 700 y predicciones bioinformáticas indican que todos ellos pueden controlar la expresión de más del 30% del total de proteínas (Filipowicz *et al.*, 2008). La mayoría son transcritos por la RNA Pol II desde genes individuales o desde transcritos policistrónicos

para varios de ellos a la vez. Se generan como pre-miRs más largos que se procesan en el núcleo por una Ribonucleasa III (Drosha), salen a citoplasma vía mecanismos dependientes de Exportina-5 y Ran-GTP y allí son finalmente procesados por otra Ribonucleasa III (Dicer) a su forma madura (Rana 2007). Su función es esencial en una amplia variedad de procesos incluidos el desarrollo embrionario, la respuesta a estrés o la regulación estricta de procesos fisiológicos y por tanto, el mantenimiento de la homeostasis de los organismos. Es importante destacar que el perfil de expresión de miRNAs es específico de tipo celular y puede cambiar dependiendo del estímulo, de tal forma que el contexto celular particular de un mismo miRNA determinará su función en un tipo celular específico (Bartel 2009). Por ello, la desregulación de algunos miRNAs se ha señalado entre los mecanismos responsables del desarrollo de patologías como el cáncer (Bartels and Tsongalis, 2009), la autoinmunidad (Sonkoly and Pivarcsi 2008), la diabetes (Zhou *et al.*, 2008) o patologías vasculares (Urbich *et al.*, 2008) y se están constituyendo como biomarcadores precisos de la evolución de muchas de ellas. Muy recientemente se ha demostrando que además los miRNAs son reguladores clave en la respuesta celular rápida y precisa ante cualquier tipo de estímulo incluyendo la falta de nutrientes o la hipoxia (Ivan *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha demostrado además, que estos miRNAs junto a mRNAs pueden ser secretados o intercambiados por las células en forma de micropartículas (microvesículas de plaquetas; exosomas de células tumorales; ectosomas de neutrófilos (Valadi *et al.*, 2007). Así podrían ser detectados en fluidos corporales como sangre, orina o líquido pleural. De hecho, se estima que la sangre periférica de individuos sanos puede contener una concentración entre 5-50 mg/ml de micropartículas, que incrementaría en caso de pacientes con diversas patologías (Hunter *et al.*, 2008). Esto permitiría hacer un seguimiento muy fiable de la evolución de estas patologías utilizando muestras obtenidas mediante métodos mínimamente invasivos (extracción de sangre y recolección de orina (Gilad 2008). En orina, los miRNAs detectados, entre los que se encuentra el miR-127, han demostrado gran estabilidad, aún en condiciones muy agresivas (Melkonyan *et al.*, 2008). Dado que la desregulación de miRNAs puede causar diversas patologías, éstos están empezando a ser considerados como nuevas dianas de actuación terapéutica. De hecho, se han desarrollado herramientas para modular su expresión: pre-mirs para sobreexpresarlos y antagomirs (anti-mirs) para inhibirlos, con resultados muy esperanzadores en diversos modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* (Krutzfeld *et al.*, 2006; Care *et al.*, 2007; Van Rooij *et al.*, 2008), si bien está todavía por determinar su validez como estrategia terapéutica en humanos.

En cuanto al papel de los miRNAs en respuesta a isquemia, se ha determinado su expresión en isquemia cerebral focal en rata, estableciéndose asociación entre la expresión de miR-145 y el daño cerebral (Dharap *et al.*, 2009). En isquemia cardiaca en humanos el miR-100 y el miR-133 parecen participar en el mecanismo de daño cardiaco (Sucharov C, *et al.*, 2008). En isquemia hepática también en humanos, se ha establecido miR-223 como mediador de daño (Yu *et al.*, 2008). Por el contrario, miR-126 y miR-210 se han descrito como promotores fundamentales de angiogenesis, neovascularización y reparación tisular en res-

puesta a varios estímulos, incluida la hipoxia (Suarez and Sessa, 2009; Fasanaro *et al.*, 2008; van Solingen *et al.*, 2008). Hasta el momento no se han descrito en la literatura miRNAs modulados en I/R renal, pero sí se comienza a especular con su potencial como biomarcadores en patologías renales, incluidas aquellas que conllevan alteraciones en la regulación de la tensión arterial (Liang M *et al.*, 2009). En otro contexto, se han identificado algunos miRNAs relacionados con el rechazo inmunológico en el trasplante renal (Sui *et al.*, 2008).

Todo lo expuesto anteriormente justifica la necesidad de identificar y validar nuevos biomarcadores de evolución de daño renal más precisos e indicativos de qué compartimento tisular y en qué grado se está dañando y/o recuperando, cuya determinación además sea rápida, sencilla y sin necesidad de biopsiar al paciente.

#### Descripción de la invención

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo que comprende analizar una muestra obtenida de un paciente, para determinar el nivel de expresión del micro-RNA miR-127, comparar dicho nivel de expresión con un valor control, donde la alteración de dicho nivel es indicativo de daño renal.

En un aspecto más en particular de la presente invención, la muestra del paciente a analizar es sangre. En otro aspecto en particular de la presente invención, la muestra es suero. En otro aspecto de la presente invención, la muestra es orina.

En un aspecto más en particular, la disminución del nivel de expresión de miR-127 en suero con respecto al valor control es indicativa de daño renal agudo.

En un aspecto más en particular, el aumento del nivel de expresión de miR-127 en orina con respecto al valor control es indicativo de daño renal agudo.

En la presente invención por daño renal agudo se refiere al daño renal que tenga etiología isquémica ya sea primaria o secundaria, como es el caso del daño renal por tóxicos o por medios de radiocontraste, y en cualquier caso, excluyendo el daño renal crónico.

En un aspecto más en particular de la presente invención, la expresión del micro-RNA se determina mediante POR. En un aspecto más en particular, la expresión del micro-RNA se determina mediante POR cuantitativa. En un aspecto más en particular, la expresión de micro-RNA se determina mediante POR multiplex.

En otro aspecto más en particular de la presente invención, la expresión del micro-RNA se determina mediante micromatrices de RNA total.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un kit para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo que comprende las sondas y cebadores necesarios para llevar a cabo el método de la presente invención.

En un aspecto más en particular de la presente invención, el kit comprende las sondas y cebadores necesarios para determinar el nivel de expresión del micro-RNA miR-127.

En otro aspecto más en particular de la presente invención, el kit comprende una micromatriz de ARN.

#### Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la expresión de miR-127 en células proximales tubulares humanas HK-2 sometidas

das al protocolo de Hipoxia/Reoxigenación. NX: células en condiciones normales en cuanto a disponibilidad de oxígeno (normoxia, 21%) y a disponibilidad de nutrientes (medio completo 10% FBS) CC: células control que han sufrido restricción de nutrientes (están en medio sin nutrientes). Hyp: células que han sufrido restricción de nutrientes y oxígeno (1% de oxígeno en medio sin nutrientes); R-3, R-6, R-24 h: células que vuelven a estar en condiciones normales de disponibilidad de oxígeno y nutrientes.

La figura 2 muestra la expresión de miR-127 en células proximales tubulares de rata NRK-52E sometidas al protocolo de Hipoxia/Reoxigenación. NX: células en condiciones normales en cuanto a disponibilidad de oxígeno (normoxia, 21%) y a disponibilidad de nutrientes (medio completo 10% FBS) CC: células control que han sufrido restricción de nutrientes (están en medio sin nutrientes). Hyp: células que han sufrido restricción de nutrientes y oxígeno (1% de oxígeno en medio sin nutrientes); R-15 min, R-30 min, R-1 h, R-3 h, R-6 h, R-24 h: células que vuelven a estar en condiciones normales de disponibilidad de oxígeno y nutrientes.

La figura 3 muestra la expresión de miR-127 en células endoteliales humanas HMEC sometidas al protocolo de Hipoxia/Reoxigenación. NX: células en condiciones normales en cuanto a disponibilidad de oxígeno (normoxia, 21%) y a disponibilidad de nutrientes (medio completo 10% FBS) CC: células control que han sufrido restricción de nutrientes (están en medio sin nutrientes). Hyp: células que han sufrido restricción de nutrientes y oxígeno (1% de oxígeno en medio sin nutrientes); R-15 min, R-30 min, R-1 h, R-3 h, R-24 h: células que vuelven a estar en condiciones normales de disponibilidad de oxígeno y nutrientes.

La figura 4 muestra la expresión de miR-127 en suero de pacientes diagnosticados de Fracaso Renal Agudo (FRA) de etiología isquémica. Control: expresión de miRNA en control sano igualado a 1. Los datos de expresión en el paciente están relativizados a este dato. 0 h, y 3 días: tiempos en los que se ha tomado muestra del paciente, al ingresar por FRA (0 h) y más tarde en su evolución (3 días).

La figura 5 muestra la expresión de miR-127 en orina de pacientes diagnosticados de Fracaso Renal Agudo (FRA) de etiología isquémica. Control: expresión de miRNA en control sano igualado a 1. Los datos de expresión en el paciente están relativizados a este dato. 0 h, y 3 días: tiempos en los que se ha tomado muestra del paciente, al ingresar por FRA (0 h) y más tarde en su evolución (3 días).

#### Descripción detallada de la invención

Se identificó mediante el uso de arrays que el micro-RNA: miR-127, en un modelo de H/R que mimetiza I/R, se expresó de forma diferencial de tal forma que este micro-RNA solo o en conjunto sirve como biomarcador del daño renal.

#### Ejemplo 1

#### Expresión de miRNAs en líneas celulares sometidas a hipoxia/reoxigenación

Se procedió al cultivo de las siguientes células (HK2: células tubulares proximales humanas, NRK-52E: células tubulares proximales de rata y HMEC: células endoteliales de microvasculatura humana) en medios apropiados conteniendo suero, antibióticos y factores de crecimiento específicos. Se mantuvieron a 37°C, en atmósfera húmeda y con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Las líneas celulares descritas anteriormente fue-

ron sometidas a un protocolo de hipoxia/reoxigenación. Es decir, las líneas celulares son sometidas a cambios en las tensiones de oxígeno y en la disponibilidad de nutrientes. Para ello se utilizaron dos incubadores diferentes: la hipoxia en un incubador hermético a 37°C, perfundido con una mezcla de 5% CO<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>; la reoxigenación, en un incubador estándar a 37°C, con 5% CO<sub>2</sub>. Las células fueron crecidas hasta confluencia y privadas de suero 24 horas antes de la hipoxia. Durante la hipoxia, se mantuvieron en medio mínimo (HBSS) sin suero, con baja concentración de glucosa o derivados. Durante la reoxigenación se utilizó un medio completo (Sáenz-Morales *et al.*, 2006). El tiempo de hipoxia para todas las muestras fue de 6 h, y los tiempos de reoxigenación variables (15 min-72 h). Todos los experimentos *in vitro* se repitieron al menos 3 veces.

A continuación se determinó la expresión de los distintos micro-RNAs en las líneas celulares mediante POR, para ello y tras la extracción del RNA total de las muestras de fluidos (suero u orina) y valorarlo, se utilizó 50 nanogramos de cada una de ellas para la reacción de retrotranscripción (RT) en 15 microlitros. Para este paso se utilizaron cebadores comerciales especiales (stem loop primers). Estos cebadores fueron específicos para cada miRNA. Tras la RT, se procedió a la reacción de amplificación de forma cuantitativa (qPCR). En esta reacción que fue llevada a cabo en un volumen total de 10 microlitros, se utilizó 1 microlitro de la reacción total de RT y cebadores específicos para cada miRNA y además sonda Taqman con atrapadores de fluorescencia. Todos los reactivos, tanto cebadores como mezclas de reacción con enzimas y nucleótidos para RT y POR se utilizaron de Applied Biosystems. Los resultados fueron los siguientes:

Como muestra la figura 1, el miR-127 aumentó su expresión en la condición de hipoxia en comparación con la condición de normoxia. La expresión de este miRNA disminuyó de forma significativa en reoxigenación, volviendo a aumentar a las 24 h de reoxigenación cuando la monocapa epitelial se está recuperando. Así, el aumento de expresión de miR-127 en células proximales durante la condición de hipoxia fue indicativo de isquemia renal. La disminución de su expresión tempranamente en reoxigenación, indicó daño isquémico y su incremento posterior indicó recuperación endotelial.

Como muestra la figura 2 y al igual que sucedió en células Hk-2 (tubulares humanas) miR-127 aumentó su expresión en la condición de hipoxia en la que está restringida la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno, en comparación con la condición de normoxia. La expresión de este miRNA se fue normalizando rápidamente en reoxigenación donde volvieron a estar disponibles el oxígeno y los nutrientes. El aumento de expresión de este miRNA en células proximales durante la condición de hipoxia fue indicativo de isquemia renal.

Como muestra la figura 3 y al igual que sucedía en células proximales tubulares miR-127 aumentó su expresión en la condición de hipoxia en la que estaba restringida la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno, en comparación con la condición de normoxia. La expresión de este miRNA se mantuvo elevada en reoxigenación donde se dispuso de oxígeno y nutrientes, y comenzó a normalizarse a 24 h de reoxigenación. El aumento de expresión de este miRNA en células endoteliales durante la condición de hipoxia fue in-

dicativo de isquemia renal. Su elevada expresión en reoxigenación se asoció a un estado de activación endotelial (pro-inflamatorio), el cual comenzaría a normalizarse a las 24 h.

#### Ejemplo 2

#### *Expresión de miRNAs en pacientes que han sido diagnosticados de fracaso renal agudo*

El estudio con muestras de pacientes se hizo de forma prospectiva. Tras autorización por parte de los pacientes o sus representantes legales mediante el pertinente consentimiento informado y previa aprobación del estudio por el Comité Ético de Investigación Clínica de nuestro Hospital, se extrajeron muestras de sangre y orina y biopsias renales en caso de trasplante de los grupos de pacientes que se describen a continuación.

#### *Muestras de pacientes de trasplante renal*

Se analizaron muestras procedentes de 50 trasplantados (enfermos con trasplante renal de novo y con diferentes regímenes de inmunosupresión), organizados en dos grupos:

I. 25 enfermos con función inmediata del injerto

II. 25 enfermos con función retrasada del injerto.

Se recogieron muestras de sangre y orina los días 1, 7, 15, 30 pos-trasplante renal y en ellos se determinó la expresión de los miRNAs a estudiar por qRT-PCR.

En caso de no función del injerto se realizó una biopsia al séptimo día, que se repitió cada 7-10 días hasta que se resolvió la fase de NTA. En caso de sospecha de rechazo y tras su confirmación por biopsia, estos pacientes fueron excluidos.

En el caso de los pacientes trasplantados, se recogió y dispuso de la siguiente información:

- Características del receptor: edad, sexo, tiempo en diálisis.

- Características del donante: tipo de donante (muerte encefálica, asistolia), edad, sexo, necesidad de drogas vasoactivas y última creatinina.

- Características del injerto: tiempos de isquemia caliente, fría y de anastomosis. Compatibilidad HLA e inmunosupresión.

- Función del injerto a 2, 4 y 12 semanas.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos VACUETTE (z serum sep clot activator) de 8 ml, que fueron centrifugados a 2.500 rpm 10 minutos.

Se recogió el suero separado por centrifugación y se alicuotaron y almacenaron conforme a los criterios del Biobanco del Hospital Ramón y Cajal (en tubos anonimizados, con código único y a -80°C).

Las muestras de orina se recogieron en viales de orina Standard o extrajeron del depósito de la sonda, se centrifugaron a 2.800 rpm 10 min para eliminar sedimentos y otros restos, y se alicuotaron y almacenaron conforme a los criterios del Biobanco del Hospital Ramón y Cajal (en tubos anonimizados, con código único y a -80°C).

De todas ellas se solicitó su cesión por parte del Biobanco mediante acuerdos de cesión. Se solicitaron un máximo de 500 microlitros, ya que hemos optimizado la técnica para amplificar miRNAs en muestras de 100-200 microlitros de ambos fluidos, median-

te POR cuantitativa, para ello y tras la extracción del RNA total de las muestras de fluidos (suero u orina) y valorarlo, se utilizó 50 nanogramos de cada una de ellas para la reacción de retrotranscripción (RT) en 15 microlitros. Para este paso se utilizaron cebadores comerciales especiales (stem loop primers). Estos cebadores fueron específicos para cada miRNA. Tras la RT, se procedió a la reacción de amplificación de forma cuantitativa (qPCR). En esta reacción que fue llevada a cabo en un volumen total de 10 microlitros, se utilizó 1 microlitro de la reacción total de RT y cebadores específicos para cada miRNA y además sonda Taqman con atrapadores de fluorescencia. Todos los reactivos, tanto cebadores como mezclas de reacción con enzimas y nucleótidos para RT y POR se utilizaron de Applied Biosystems.

El procesamiento de las muestras de suero y orina de pacientes anterior a la extracción de RNA total fue el siguiente: una alícuota de 100-200 microlitros de suero u orina, se digirieron con Proteinasa K (0,65 miligramos/mililitro) incubando a 56°C, 1 h. Tras ello se realizó una primera extracción con fenol/cloroformo (5:1) y la fase acuosa se procesó utilizando el kit High Pure miRNA isolation Kit (Roche), siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### *Muestras de Pacientes tras Cirugía Cardíaca*

Se analizaron muestras procedentes de 50 pacientes, organizados en los siguientes grupos:

- IA: 10 pacientes adultos operados de forma programada con circulación extracorpórea (CEC) y con bajo riesgo para el desarrollo de FRA, es decir, pacientes con una puntuación de 0 a 2 en el sistema de Thakar5 o de 0 a 1 en el simplificado SRI6.

- IB: 10 pacientes pediátricos con cardiopatías congénitas intervenidos por primera vez con CEC.

- II: 15 pacientes adultos operados de forma programada con CEC, con función renal basal alterada y puntuaciones > 5 en el sistema de Thakar5 o  $\geq 3$  en el SRI6.

- III: 15 pacientes adultos operados de forma programada con CEC, con función renal basal normal y con las mismas puntuaciones que en el apartado anterior.

Para cada paciente se hicieron determinaciones de los miRNAs citados en los siguientes momentos:

- Basal preoperatorio

- A las 2 h del ingreso en UCI

- A las 24 h, 48 h y 72 h de la cirugía

- En el día +7 (opcional para los grupos IA y IB).

Como se muestra en la figura 4, la expresión del miR-127 estuvo muy disminuida respecto al control sano. Indicando que la disminución en la expresión de este miRNA en el suero de pacientes fue indicador de daño renal isquémico o FRA.

Como muestra la figura 5, y en correlación con la disminución en suero, la expresión del miR-127 aumentó significativamente respecto al control sano. La disminución en la expresión de este miRNA en el suero de pacientes y su correspondiente aumento en orina fue indicador de diagnóstico temprano de daño renal isquémico o FRA.

# REIVINDICACIONES

1. Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo que comprende analizar una muestra obtenida de un paciente, para determinar el nivel de expresión del micro-RNA miR-127, y comparar dicho nivel de expresión con un valor control, donde la alteración de dicho nivel es indicativo de daño renal agudo.

2. Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo según la reivindicación 1, donde la muestra a analizar es seleccionada entre sangre, suero u orina.

3. Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la disminución del nivel de expresión de miR-127 en suero con respecto al valor control es indicativo de daño renal agudo.

4. Método para el diagnóstico y/o pronóstico de

daño renal agudo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el aumento del nivel de expresión de miR-127 en orina con respecto al valor control es indicativo de daño renal agudo.

5. Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la expresión del micro-RNA se determina mediante PCR.

6. Método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la expresión del micro-RNA se determina mediante PCR cuantitativa.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el nivel de expresión del micro-RNA se determina mediante micromatrices de RNA.

8. Kit para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo que comprende las sondas y cebadores necesarios para determinar el nivel de expresión del micro-RNA miR-127.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

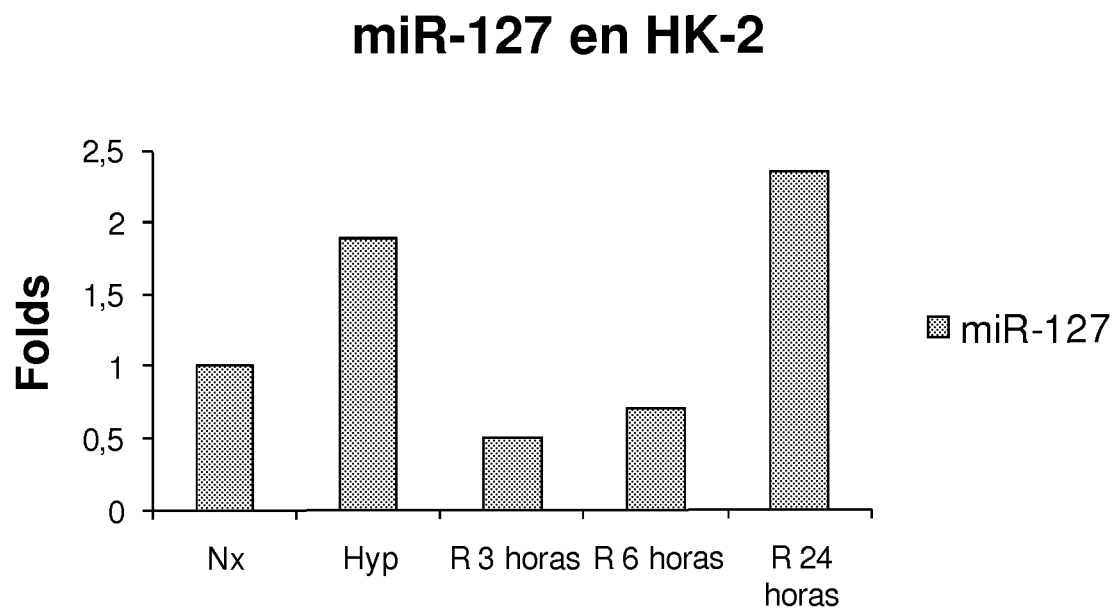


FIG. 2

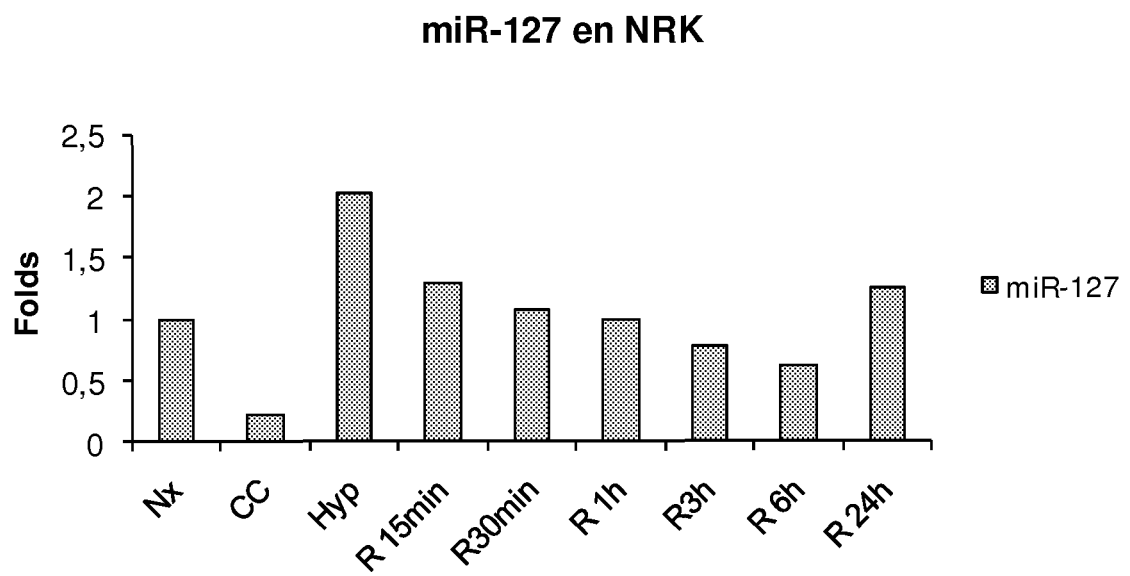


FIG. 3

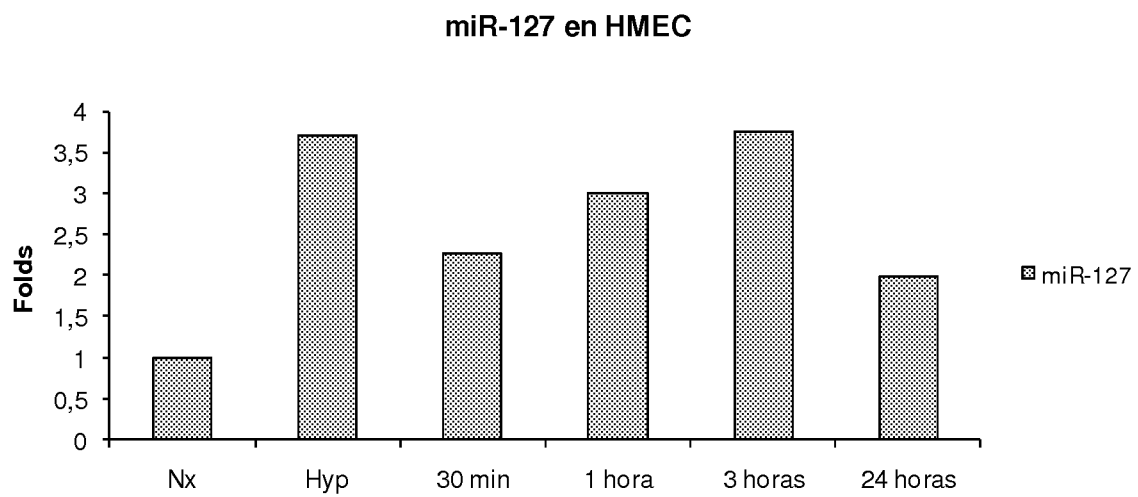


FIG. 4

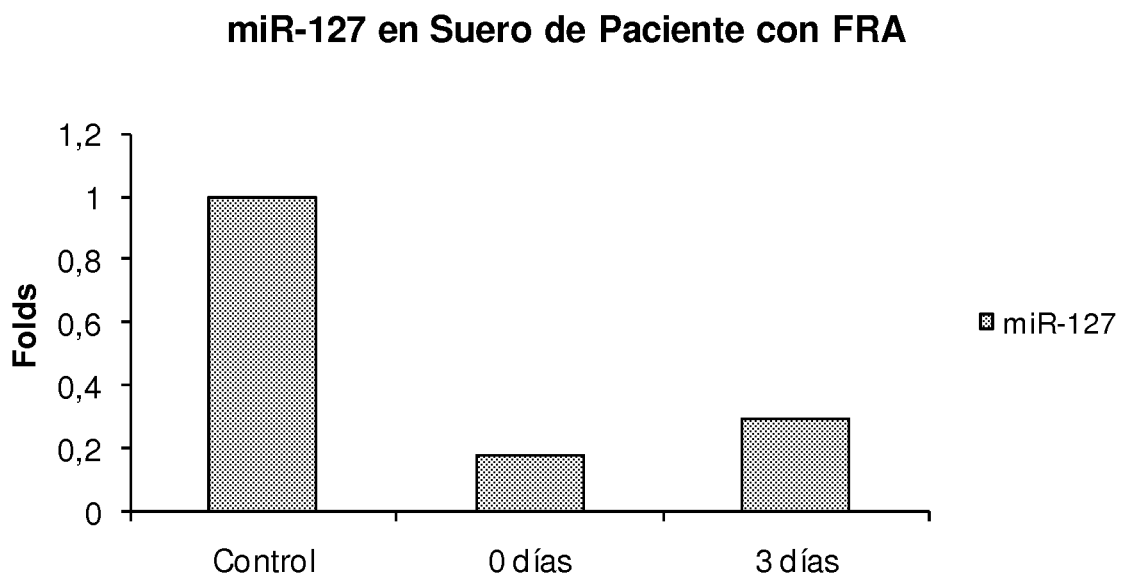
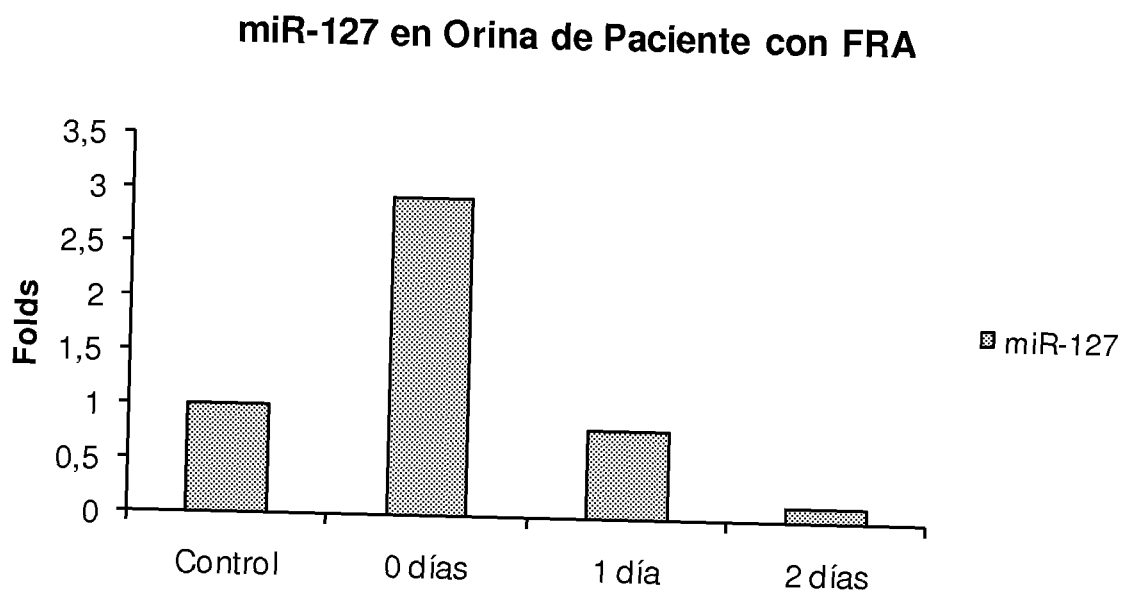




FIG. 5





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901825

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.09.2009

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LIANG M. et al., "MicroRNA: a new frontier in kidney and blood pressure research", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: RENAL PHYSIOLOGY, Sep 2009, Vol. 297, No. 3, Páginas F553-F558, ISSN: 0363-6127, Epub: 01.04.2009, todo el documento.	1-8
A	KATO, M. et al., "MicroRNAs and their role in progressive kidney diseases", CLINICAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, Jul 2009, Vol. 4, No. 7, Páginas 1255-1266, ISSN: 1555-9041, todo el documento.	1-8
A	JUNG, M. et al., "MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy", JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE, Sep 2009, Vol. 13, No.9B, Páginas 3918-3928, ISSN: 1582-1838, Epub: 17.02.2009, todo el documento.	1-8
A	WO 2009/038742 A2 (CARITAS ST. ELIZABETH'S MEDICAL CENTER OF BOSTON, INC.) 26-03-2009, todo el documento.	1-8
A	WO 2007/013919 A2 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 01-02-2007, todo el documento.	1-8

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
21.07.2011

Examinador  
J. Vizán Arroyo

Página  
1/4

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.07.2011

**Declaración****Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-8  
Reivindicaciones

SI  
NO

**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones 1-8  
Reivindicaciones

SI  
NO

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Liang M. et al., <i>Am. J. Physiol. Renal Physiol.</i> , (Sep 2009), <u>297</u> (3):F553-8. Epub: 01-04-2009	01-04-2009
D02	Kato, M. et al., <i>Clin. J. Am. Soc. Nephrol.</i> , (Jul 2009), <u>4</u> (7): 1255-66.	Jul 2009
D03	Jung, M. et al., <i>J. Cell Mol. Med.</i> , (2009 Sep), <u>13</u> (9B): 3918-28. Epub: 17-02-2009	17-02-2009
D04	WO 2009/038742 A2	26-03-2009
D05	WO 2007/013919 A2	01-02-2007

En D1-D3 se analiza la implicación de microRNAs en la fisiología y patología renal.

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

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

1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo que comprende analizar en una muestra de un paciente el nivel de expresión del microRNA miR-127. En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D1-D6, no se ha divulgado ningún método para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal agudo que comparta las mismas características técnicas del procedimiento reivindicado en la solicitud de patente. Además, dicho procedimiento no se deduce de una manera obvia combinando los procedimientos descritos previamente.

1.2. La presente solicitud no satisface los criterios establecidos en los Artículos 33(2) y 33(3) PCT, pues el objeto de las reivindicaciones 1-8 es nuevo y tiene actividad inventiva con relación al estado de la técnica definido en el Reglamento del PCT (Reglas 64(1) - (3) PCT).