

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 430**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07253514 .9**
96 Fecha de presentación: **05.09.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1905846**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

54 Título: **MARCADORES DEL RECHAZO DE TRASPLANTE DE RIÑÓN Y DAÑO RENAL.**

30 Prioridad:
05.09.2006 GB 0617429

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.04.2012

73 Titular/es:
**ELECTROPHORETICS LIMITED
COVENHAM HOUSE DOWNSIDE BRIDGE ROAD
COBHAM SURREY KT11 3EP, GB**

72 Inventor/es:
**Kienle, Stefan y
Joubert, Richard**

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 379 430 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Marcadores del rechazo de trasplante de riñón y daño renal

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a procedimientos para la detección del rechazo al trasplante de riñón y otras formas de daño renal.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] El rechazo del aloinjerto constituye el impedimento principal para el éxito del trasplante de riñón. Actualmente el rechazo crónico es la causa más prevalente de fallo del trasplante de riñón. Clínicamente, el rechazo crónico se presenta mediante la disfunción crónica del trasplante, caracterizado por una lenta pérdida de la función, a menudo en combinación con proteinuria e hipertensión. El rechazo crónico se desarrolla en injertos que experimentan daño intermitente o persistente por las respuestas celulares y humorales que resultan del reconocimiento indirecto de los aloantígenos. La opción más eficaz para evitar el fallo renal por rechazo crónico es evitar la lesión del injerto tanto por mecanismos inmunitarios como no inmunitarios junto con la inmunosupresión de mantenimiento no nefrotóxica. Los procedimientos diagnósticos disponibles en la actualidad, incluyendo la presentación clínica y los parámetros bioquímicos de la función orgánica, a menudo no consiguen detectar el rechazo hasta las fases de progresión tardías.

Resumen de la invención

25 **[0003]** Los inventores han identificado biomarcadores para la detección del rechazo de aloinjerto renal y otras formas de daño renal. La invención se refiere al diagnóstico y tratamiento del daño renal, incluyendo el rechazo de aloinjerto en trasplante de riñón, usando estos biomarcadores. El uso de los biomarcadores incluye el uso o la detección de las proteínas identificadas o sus fragmentos, ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas o sus partes complementarias, y anticuerpos que se unen a dichas proteínas.

30 **[0004]** Así, la invención proporciona el uso de la presencia o de una cantidad de precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa o uno de sus fragmentos, o anticuerpos contra dichas proteínas, o ácidos nucleicos que codifican dicha proteína o sus fragmentos, como marcador para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal. También se proporciona un procedimiento para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal, el procedimiento que comprende la determinación de la presencia o de una cantidad de precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, o uno de sus fragmentos, o anticuerpos contra dicha proteína, o ácidos nucleicos que codifican dicha proteína o sus fragmentos en una muestra procedente de un paciente.

40 **[0005]** También se proporciona el uso del precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa o uno de sus fragmentos, un anticuerpo contra dicha proteína, un ácido nucleico que codifica dicha proteína o uno de sus fragmentos, o un ácido nucleico que es el complemento de un ácido nucleico que codifica dicha proteína o uno de sus fragmentos, en un procedimiento de diagnóstico o pronóstico de daño renal.

45 **[0006]** En algunas formas de realización, el pronóstico y/o diagnóstico es el pronóstico y/o diagnóstico del rechazo crónico que sigue al trasplante de riñón, también conocido como nefropatía crónica del aloinjerto (NCA). En otras formas de realización, el pronóstico y/o diagnóstico puede ser el pronóstico y/o diagnóstico de daño renal provocado, por ejemplo, por la enfermedad o toxicidad.

50 **[0007]** En una forma de realización, el procedimiento comprende las etapas de:

(a) la puesta en contacto de una muestra procedente de un paciente con un soporte sólido que presenta inmovilizado sobre él un agente de unión que tiene sitios de unión que son capaces de unirse específicamente a la proteína, anticuerpo o ácido nucleico marcadores con una muestra procedente de un paciente en condiciones en las que la proteína, anticuerpo o ácido nucleico marcadores se unen al agente de unión; y,

55 (b) la determinación de la presencia o de una cantidad de la proteína, anticuerpo o ácido nucleico marcadores unidos al agente de unión.

[0008] La etapa (b) puede comprender (i) la puesta en contacto del soporte sólido con un agente de revelado

que sea capaz de unirse a sitios de unión ocupados, sitios de unión no ocupados o la proteína, anticuerpo o ácido nucleico marcadores, el agente de revelado que comprende un marcador químico y (ii) la detección del marcador químico para obtener un valor representativo de la presencia o de una cantidad de la proteína, anticuerpo o ácido nucleico marcadores en la muestra.

5

[0009] El marcador químico puede ser, por ejemplo, un marcador químico radiactivo, un fluoróforo, un fósforo, un colorante láser, un colorante cromógeno, una partícula coloidal macromolecular, una perla de látex que está coloreada, es magnética o paramagnética, una enzima que cataliza una reacción que produce un resultado detectable o el marcador químico es un indicador.

10

[0010] En algunas formas de realización, el agente de unión es el precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, o uno de sus fragmentos. En otras formas de realización, el agente de unión es un anticuerpo que es capaz de unirse al precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, o a uno de sus fragmentos. En otras formas de realización, el agente de unión puede ser un ácido nucleico que es complementario a la secuencia del ácido nucleico a detectar.

15

[0011] En una forma de realización alternativa, el procedimiento comprende la detección de una proteína marcadora o proteínas marcadoras en una muestra procedente de un paciente usando espectroscopía de masas. Las proteínas de la muestra pueden estar inmovilizadas sobre un soporte sólido. Opcionalmente, las proteínas se pueden someter a digestión proteolítica antes del análisis. Los procedimientos analíticos adecuados incluyen SELDI-TOF y MRM.

20

[0012] En algunas formas de realización, el procedimiento comprende la determinación de la presencia o de una cantidad de una pluralidad de proteínas, anticuerpos o ácidos nucleicos marcadores asociados a daño renal en una sola muestra. Por ejemplo, se pueden inmovilizar una pluralidad de agentes de unión como localizaciones predefinidas sobre el soporte sólido.

25

[0013] También se proporciona un kit para su uso en el diagnóstico o pronóstico de daño renal mediante la determinación de la presencia o de una cantidad de un analito seleccionado de una de las proteínas expuestas en la Tabla 4 o Tabla 5 o uno de sus fragmentos, un anticuerpo contra dicha proteína, y un ácido nucleico que codifica dicha proteína o uno de sus fragmentos, en una muestra procedente de un paciente, el kit que comprende:

30

(a) un soporte sólido que presenta un agente de unión capaz de unirse al analito inmovilizado sobre él;

35

(b) un agente de revelado que comprende un marcador químico; y,

(c) uno o más componentes seleccionados del grupo constituido por disoluciones de lavado, diluyentes y tampones. El agente de unión puede ser como se ha definido anteriormente. En particular, para la detección de un anticuerpo, el agente de unión puede ser una de las proteínas expuestas en la Tabla 4 o Tabla 5, o uno de sus fragmentos. Para la detección de una proteína, el agente de unión puede ser un anticuerpo que sea capaz de unirse al precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, o a uno de sus fragmentos. Para la detección de un ácido nucleico, el agente de unión puede ser un ácido nucleico que sea complementario a la secuencia del ácido nucleico a detectar.

40

[0014] También se proporciona un kit para su uso en el diagnóstico o pronóstico de daño renal determinando la presencia o cantidad del precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, en una muestra procedente de un paciente, el kit que comprende uno o más péptidos MRM, como se describe a continuación, en un formato compatible con el ensayo.

45

[0015] También se proporciona el uso del precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, o uno de sus fragmentos, o anticuerpos capaces de unirse específicamente a esta proteína, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de daño renal.

50

[0016] Además se proporciona el uso de la presencia o de una cantidad de un ácido nucleico que codifica al precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa o uno de sus fragmentos como marcador para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal.

55

[0017] En una forma de realización, la invención proporciona un procedimiento para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal, el procedimiento que comprende la determinación de la presencia o de una cantidad de un ácido nucleico que codifica al precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, o uno de sus fragmentos, en una

muestra procedente de un paciente.

[0018] También se proporciona un kit para su uso en el diagnóstico o pronóstico del rechazo del trasplante de riñón crónico determinando la presencia o una cantidad de un analito seleccionado entre una de las proteínas expuestas en la Tabla 4 o Tabla 5, o uno de sus fragmentos, o anticuerpos contra estos antígenos, en una muestra procedente de un paciente, el kit que comprende:

(a) un soporte sólido que presenta un agente de unión capaz de unirse al analito inmovilizado sobre él;

10 (b) un agente de revelado que comprende un marcador químico; y,

(c) uno o más componentes seleccionados del grupo constituido por disoluciones de lavado, diluyentes y tampones.

[0019] El daño renal puede incluir rechazo crónico después del trasplante de riñón, también conocido como nefropatía crónica del aloinjerto, o daño renal provocado por enfermedad o toxicidad.

[0020] Los procedimientos de la invención son, en la mayoría de los casos, procedimientos *in vitro* llevados a cabo sobre una muestra procedente de un paciente. La muestra usada en los procedimientos descritos en el presente documento puede ser una muestra de tejido o de fluido corporal, por ejemplo, una muestra de tejido renal, una muestra de sangre o de un producto sanguíneo (como suero o plasma) o una muestra de orina. En una forma de realización preferida, la muestra es una muestra limpia, es decir, una muestra de la cual se han eliminado o limpiado proteínas muy abundantes.

[0021] Los usos anteriormente mencionados de dicha proteína marcadora se pueden llevar a cabo en combinación con uno o más de adiponectina, precursor de la proteína AMBP (microglobulina $\alpha 1$), el precursor de la cadena α de la proteína de unión a C4b, el precursor de la ceruloplasmina, el precursor C3 del complemento, el precursor C9 del componente del complemento, el precursor del factor D del complemento, la glicoproteína $\alpha 1B$, el precursor I de la glicoproteína $\beta 2$, el precursor del cofactor II de la heparina, la proteína de la región C de la cadena I μ , el precursor de la glicoproteína $\alpha 2$ rica en leucinas, el precursor del factor pigmentario derivado del epitelio, el precursor de la proteína plasmática de unión a retinol y la subunidad 10 del factor 3 de iniciación de la traducción.

Breve descripción de los dibujos

[0022] Figura 1. Gel analítico en 2D de la muestra de suero C51-1 (comparación de C1 vs C3)

[0023] Figura 2. Gel analítico en 2D de la muestra de suero C51-1 (comparación de C1 vs C3)

[0024] Figura 3. Gel analítico en 2D de la muestra de suero D12-1 (comparación de D1 vs D3)

[0025] Figura 4. Gel preparativo en 2D de muestras control combinadas del grupo de estudio

[0026] Figura 5. Gel preparativo en 2D de muestras de la enfermedad combinadas del grupo de estudio

[0027] Figura 6. Histogramas de la evolución temporal de la regulación de las proteínas de muestras de la enfermedad (gris oscuro) y control (gris claro) de la Tabla 4 en los puntos de tiempo 1, 2 y 3. Eje vertical: volumen normalizado de los puntos. Eje horizontal: puntos de tiempo 1, 2 y 3.

A	Punto 61 Precursor del plasminógeno
B	Punto 210 Región C de la cadena I μ
50 C	Punto 213 Región C de la cadena I μ
D	Punto 214 Región C de la cadena I μ
E	Punto 445 Precursor I de la glicoproteína $\beta 2$
F	Punto 453 Precursor del subcomponente C1R del complemento
G	Punto 461 Precursor I de la glicoproteína $\beta 2$
55 H	Punto 466 Precursor I de la glicoproteína $\beta 2$
I	Punto 553 Precursor del factor pigmentario derivado del epitelio
J	Punto 557 Precursor del factor pigmentario derivado del epitelio
K	Punto 559 Precursor del factor pigmentario derivado del epitelio
L	Punto 563 Precursor del factor pigmentario derivado del epitelio

M	Punto 570 Precursor del factor pigmentario derivado del epitelio
N	Punto 673
O	Punto 712 Precursor de la transtiretina
P	Punto 722 microglobulina α 1
5 Q	Punto 728 microglobulina α 1
R	Punto 730 microglobulina α 1
S	Punto 734 microglobulina α 1
T	Punto 735 microglobulina α 1
U	Punto 741 microglobulina α 1
10 V	Punto 760 Precursor de la proteína 2 relacionada con el factor H del complemento
W	Punto 771 Precursor C3 del complemento, cadena α
X	Punto 781 Precursor C3 del complemento, cadena α /Precursor C4 del complemento
Y	Punto 785 Precursor del factor D del complemento
Z	Punto 760 Precursor D del complemento
15 AA	Punto 825 Precursor de la proteína plasmática de unión al retinol
BB	Punto 826 Precursor de la proteína plasmática de unión al retinol
CC	Punto 847 Precursor de la glicoproteína β 2

[0028] Figura 7. Histogramas de la evolución temporal de las regulaciones de la proteína procedentes de muestras de la enfermedad (gris oscuro) y control (gris claro) de la Tabla 4 en los puntos de tiempo 1, 2 y 3. Eje vertical: volumen normalizado de los puntos. Eje horizontal: puntos de tiempo 1, 2 y 3.

A	Punto 56 Precursor de la ceruloplasmina (Ferroxidasa)
B	Punto 113 Precursor del factor B del complemento
25 C	Punto 149 Precursor de la macroglobulina α 2
D	Punto 150 Precursor de la macroglobulina α 2
E	Punto 238 Precursor H1 de la cadena pesada del inhibidor de la inter- α -tripsina
F	Punto 242 Precursor H1 de la cadena pesada del inhibidor de la inter- α -tripsina
G	Punto 243 Precursor H1 de la cadena pesada del inhibidor de la inter- α -tripsina
30 H	Punto 463 Precursor del subcomponente C1R del complemento
I	Punto 464 Precursor del subcomponente C1R del complemento
J	Punto 498
K	Punto 510 Precursor de la hemopexina (glicoproteína β 1B)
L	Punto 515 Precursor de la hemopexina (glicoproteína β 1B)
35 M	Punto 551 Precursor de la hemopexina (glicoproteína β 1B)
N	Punto 562 Precursor de la glicoproteína α 2 rica en leucinas
O	Punto 622 Precursor de la apolipoproteína A-IV
P	Punto 657 Subunidad 10 del factor 3 de iniciación de la traducción/Precursor de la ceruloplasmina
Q	Punto 711 Precursor C4-A del complemento/Precursor C4-B del complemento
40 R	Punto 854 Precursor de la glicoproteína α 1B

[0029] Fig 9. Representación de las puntuaciones de ACP del grupo de datos control que contiene todos los geles.

45 **[0030]** Fig 10. Representación de las puntuaciones de ACP del grupo de datos control sin los geles aislados.

[0031] Fig 11. Representación de las puntuaciones de ACP del grupo de datos de la enfermedad que contiene todos los geles.

50 **[0032]** Fig 12. Representación de las puntuaciones de AD-MCP de los grupos Control/1 y Control/3.

[0033] Fig 13. Representaciones de las cargas de AD-MCP (números de los puntos) de los grupos Control_1 y Control_3. Con la tipografía más clara se indican los números de los puntos que se han seleccionado con el enfoque del gel 2D.

55

[0034] Fig 14. Representaciones de las cargas de MCP de los grupos de Enfermedad/1 y Enfermedad/3.

[0035] Fig 15. Representaciones de las cargas de AD-MCP (números de los puntos) de los grupos Enfermedad/1 y Enfermedad/3. Con la tipografía más clara se indican los números de los puntos que se han

seleccionado con el enfoque del gel 2D.

[0036] Fig 16. Representación de la puntuación de ACP de los grupos Control/1 y Enfermedad/1.

5 [0037] Fig 17. Representación de las puntuaciones de MCP del grupo de datos de la Muestra/1.

[0038] Fig 18. Representaciones de las cargas de MCP de los grupos de la Muestra/1. Con la tipografía más clara se indican los números de los puntos que se han seleccionado con el enfoque del gel 2D.

10 [0039] Fig 19. Representaciones de las cargas de ACP de los grupos Control/3 y Enfermedad/3.

[0040] Fig 20. Representaciones de la puntuación de MCP de geles procedentes del grupo de datos de la Muestra/3.

15 Descripción detallada

Daño renal

[0041] El daño renal puede aparecer como consecuencia de, por ejemplo, rechazo del trasplante, enfermedad, toxicidad y lesión isquémica.

[0042] El rechazo de trasplante de riñón es preferentemente rechazo crónico, que normalmente se define como rechazo que se produce seis meses o más después del trasplante. El rechazo también puede ser rechazo agudo, normalmente definido como rechazo que se produce hasta seis meses después del trasplante.

25 [0043] La enfermedad pueden incluir el síndrome de Alport, la amiloidosis, la diabetes y enfermedad del riñón, enfermedad de Fabry, glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS), púrpura de Henoch-Schoenlein, nefropatía por IgA (enfermedad de Berger), enfermedad policística infantil, cálculos renales, síndrome de hematuria, lupus y lupus y enfermedad del riñón, glomerulonefritis membranoproliferativa (GNMP), poliarteritis microscópica, nefropatía de cambios mínimos, nefropatía por reflujo, estenosis de la arteria renal, vasculitis, reflujo vesico-ureteral y granulomatosis de Wegener.

[0044] La toxicidad puede ser, por ejemplo, un efecto secundario del tratamiento farmacológico.

35 Proteína marcadora

[0045] Las proteínas marcadoras descritas en el presente documento pueden ser útiles de diversas formas en el diagnóstico, pronóstico o tratamiento. Las propias proteínas, o uno de sus fragmentos, se pueden detectar en un ensayo diagnóstico o pronóstico como se describe a continuación.

40 [0046] La proteína marcadora es el precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa.

[0047] El término "proteína marcadora" o "biomarcadores" incluye todas las formas relevantes de la proteína identificada, incluyendo las formas modificadas post-traduccionales. Por ejemplo, la proteína marcadora puede estar presente en el tejido corporal en una forma glicosilada, fosforilada, multimérica o en forma de precursor.

[0048] Los fragmentos de proteínas a detectar o a usar para la detección pueden tener una longitud de 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 60 o más, 70 o más, 80 o más, 100 o más, 150 o más, 200 o más, 250 o más, 300 o más, 350 o más, 400 o más, o 500 o más aminoácidos.

50 [0049] Los fragmentos de ácidos nucleicos a detectar o a usar para la detección pueden tener una longitud de 10 o más, 20 o más, 30 o más, 40 o más, 60 o más, 70 o más, 80 o más, 100 o más, 150 o más, 200 o más, 250 o más, 300 o más, 350 o más, 400 o más, 500 o más, 600 o más, 700 o más, 800 o más, 900 o más o 1000 o más bases.

55 Detección

[0050] Una proteína marcadora puede tener su expresión modulada, es decir, cuantitativamente incrementada o reducida, en pacientes con daño renal. El grado en el cual la expresión difiere entre el estado normal con respecto

al estado dañado sólo tiene que ser suficientemente grande para poder visualizarse mediante técnicas de caracterización habituales, tales como tinción con plata de geles electroforéticos en 2D o procedimientos de detección inmunológicos, incluyendo transferencia de Western o radioinmunoensayo. Los expertos en la materia conocen bien otras técnicas de caracterización habituales mediante las cuales se pueden visualizar las diferencias de expresión. Éstas incluyen separaciones cromatográficas sucesivas de fracciones y comparaciones de los picos, electroforesis capilar, separaciones usando redes de microcanales, incluyendo sobre un microchip, y procedimientos de espectrometría de masas incluyendo SELDI_TOF y MRM.

[0051] Las separaciones cromatográficas se pueden llevar a cabo mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento como se describe en la bibliografía farmacéutica, con el cromatograma que se obtiene en forma de gráfica de absorbancia de luz a 280 nm frente al tiempo de separación. El material que proporciona picos no completamente resueltos a continuación se vuelve a someter a cromatografía, y así sucesivamente.

[0052] La electroforesis capilar es una técnica descrita en muchas publicaciones, por ejemplo, en la bibliografía "Total CE Solutions" suministrada por Beckman con su sistema P/ACE 5000. La técnica depende de la aplicación de un potencial eléctrico a través de la muestra contenida en un pequeño tubo capilar. El tubo presenta una superficie cargada, tal como un cristal de silicato cargado negativamente. Los iones con carga contraria (en este caso, iones positivos) son atraídos a la superficie y a continuación migran hacia el electrodo apropiado de la misma polaridad que la superficie (en este caso, el cátodo). En este flujo electroosmótico (EOF) de la muestra, los iones positivos se mueven más rápido, seguidos del material no cargado y de los iones cargados negativamente. Así, las proteínas se separan esencialmente según su carga.

[0053] Las redes de microcanales funcionan de manera similar a capilares y se pueden formar mediante fotoseparación de un material polimérico. En esa técnica, se usa un láser UV para generar pulsos de luz de alta energía que se disparan en ráfagas sobre polímeros que tienen características de absorción UV adecuadas, por ejemplo, polietilentereftalato o policarbonato. Los fotones incidentes rompen los enlaces químicos en un espacio confinado, lo que da lugar a un incremento de la presión interna, mini-explisiones y eyección del material separado, dando lugar a huecos que forman microcanales. El microcanal material consigue una separación en base al EOF, como para la electroforesis capilar. Se puede adaptar en forma de microchip, cada chip que tiene su propio inyector de muestras, columna de separación y detector electroquímico: véase J.S. Rossier y col., 1999, Electrophoresis 20: páginas 727-731.

[0054] Otros procedimientos incluyen la realización de un ensayo de unión para la proteína marcadora. Se puede usar cualquier agente de unión razonablemente específico. Preferentemente el agente de unión está marcado químicamente.

[0055] Preferentemente el ensayo es un inmunoensayo, especialmente entre el marcador y un anticuerpo que reconoce la proteína, especialmente un anticuerpo marcado químicamente. Puede ser un anticuerpo generado contra parte o contra toda la proteína marcadora, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o antisero policlonal dirigido contra ser humano de alta especificidad para la proteína marcadora.

[0056] Cuando el ensayo de unión sea un inmunoensayo, se puede llevar a cabo midiendo el grado de interacción proteína/anticuerpo. Se puede usar cualquier procedimiento de inmunoensayo conocido. Se prefiere un ensayo de tipo sándwich. En un ejemplo de ensayo de tipo sándwich, un primer anticuerpo para la proteína marcadora se une a la fase sólida, como un pocillo de una placa de microtitulación de plástico, y se incuba con la muestra y con un segundo anticuerpo marcado químicamente específico para la proteína sometida a ensayo. Alternativamente, se puede usar un ensayo de captura de anticuerpo. Aquí, se deja que la muestra de prueba se una a una fase sólida, y a continuación se añade el anticuerpo dirigido contra la proteína marcadora y se deja que se unan. Después de retirar lavando el material no unido, la cantidad de anticuerpo unido a la fase sólida se determina usando un segundo anticuerpo marcado químicamente, dirigido contra el primero.

[0057] En otra forma de realización, se lleva a cabo un ensayo de competición entre la muestra y una proteína marcadora marcada químicamente o un péptido derivado de la misma, con estos dos antígenos en competición por una cantidad limitada de anticuerpo dirigido contra la proteína marcadora unida a un soporte sólido. La proteína marcadora marcada químicamente o uno de sus péptidos se puede incubar previamente con el anticuerpo sobre la fase sólida, por lo que la proteína marcadora de la muestra desplaza parte de la proteína marcadora o uno de sus péptidos unido al anticuerpo.

[0058] En otra forma más de realización, se deja que los dos antígenos compitan en una única incubación

simultánea con el anticuerpo. Después de retirar del soporte mediante lavado el antígeno no unido, se determina la cantidad de marcador químico unido al soporte y se mide la cantidad de proteína en la muestra en referencia a curvas de titulación patrón establecidas previamente.

- 5 **[0059]** El agente de unión en el ensayo de unión puede ser un agente de unión específico marcado químicamente, que puede ser un anticuerpo u otro agente de unión específico. Normalmente el propio agente de unión estará marcado químicamente, pero se puede detectar de manera alternativa con una reacción secundaria en la que se genera una señal, por ejemplo, procedente de otra sustancia marcada químicamente.
- 10 **[0060]** El marcador químico puede ser una enzima. El sustrato para la enzima puede ser, por ejemplo, una sustancia formadora de color, fluorescente o quimioluminiscente.
- 15 **[0061]** Se puede usar una forma amplificada del ensayo, por la cual se produce una "señal" potenciada a partir de un nivel de proteína a detectar relativamente bajo. Una forma particular de inmunoensayo amplificado es el ensayo quimioluminiscente mejorado. De manera conveniente, el anticuerpo se marca químicamente con peroxidasa de rábano, que participa en una reacción quimioluminiscente con luminol, un sustrato peróxido y un compuesto que potencia la intensidad y la duración de la luz emitida, normalmente 4-yodofenol o ácido 4-hidroxycinnámico.
- 20 **[0062]** Otra forma de inmunoensayo amplificado es la inmuno-PCR. En esta técnica, el anticuerpo está unido covalentemente a una molécula de ADN arbitraria que comprende cebadores de PCR, por lo que el ADN con el anticuerpo unido a él se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Véase E. R. Hendrickson y col., *Nucleic Acids Research* 23: 522-529 (1995). La señal se lee como anteriormente.
- 25 **[0063]** El tiempo necesario para el ensayo se puede reducir con el uso de un inmunoensayo turbidimétrico mejorado con micropartículas rápidas, como del tipo representado por M. Robers y col., "Development of a rapid microparticle-enhanced turbidimetric immunoassay for plasma fatty acid-binding protein, an early marker of acute myocardial infarction", *Clin. Chem.* 1998; 44:1564-1567.
- 30 **[0064]** Debería ser posible la automatización total de cualquier inmunoensayo contemplado en un analizador químico de uso generalizado en clínica, como el sistema COBAS™ MIRA Plus de Hoffmann-La Roche, descrito por M. Robers y col. anteriormente, o el sistema AxSYM™ de Abbott Laboratories, y se debería poder aplicar para el diagnóstico clínico rutinario de daño renal, incluyendo rechazo de trasplante de riñón.
- 35 **[0065]** Alternativamente, la muestra diagnóstica se puede someter a gel de electroforesis bidimensional para dar un gel teñido y la concentración incrementada o reducida de la proteína se puede detectar por medio de una intensidad incrementada o reducida de un punto que contiene la proteína sobre el gel teñido, en comparación con un control o un gel comparativo correspondiente. La invención incluye dicho procedimiento, independientemente de la identificación de la proteína marcadora proporcionada anteriormente.
- 40 **[0066]** En otro procedimiento, la muestra diagnóstica se puede someter a espectrometría de masas en tiempo de vuelo mediante desorción/ionización por láser de superficie (SELDI-TOF). En este procedimiento normalmente la muestra es un fluido corporal y se añade a la superficie de un ProteinChip para SELDI-TOF antes de analizarlo en el espectrómetro de masas SELDI-TOF. Los procedimientos generales del análisis SELDI-TOF para muestras de tejido humano se encuentran en la solicitud de patente internacional WO 01/25791. El sistema ProteinChip consta de chips de aluminio a los cuales se pueden unir selectivamente muestras de proteínas sobre la superficie química del chip (por ejemplo, aniónicas, catiónicas, hidrófobas, hidrófilas, etc.). A continuación las proteínas unidas se cristalizan simultáneamente con un exceso molar de moléculas pequeñas que absorben energía. A continuación el chip se analiza mediante pulsos cortos e intensos de láser UV de N₂ a 320 nm realizando la separación y detección de la proteína mediante la espectrometría de masas en tiempo de vuelo. Los perfiles espectrales de cada grupo dentro de un experimento se comparan y cualquier pico de interés se puede analizar posteriormente usando técnicas como las descritas a continuación para establecer la identidad de la proteína.
- 45 **[0067]** La muestra diagnóstica se puede someter a análisis mediante monitorización por reacción múltiple (MRM) en un espectrómetro de masas con trampa de iones. Basándose en los perfiles de espectrometría de masas de las proteínas marcadoras descritas a continuación se identifican péptidos trípticos únicos con masas conocidas y secuencias de aminoácidos específicas que poseen buenas características ionizantes. A continuación el espectrómetro de masas se programa para reconocer específicamente péptidos de la masa y secuencia específicas y presentar su intensidad de señal relativa. Usando la MRM es posible reconocer hasta 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 ó 100 proteínas marcadoras diferentes en un solo barrido de LC-MS. Las intensidades de los péptidos MRM de las

proteínas marcadoras en la muestra diagnóstica se comparan con aquellas encontradas en muestras procedentes de sujetos con daño renal y/o rechazo de trasplante de riñón que permite realizar el diagnóstico de daño renal y/o rechazo de trasplante de riñón.

5 **[0068]** El ensayo MRM se puede llevar a cabo de una manera más estrictamente cuantitativa con el uso de patrones de referencia internos que consisten en péptidos sintéticos de cuantificación absoluta (AQUA) correspondientes al péptido MRM de la proteína marcadora donde uno o más átomos de carbono han sido sustituidos con un isótopo estable tal como carbono 14 o nitrógeno 15 y donde dichas sustituciones provocan que el péptido AQUA tenga una diferencia de masa definida con el péptido MRM nativo obtenido de la muestra diagnóstica.
10 Comparando la intensidad iónica relativa de los péptidos MRM nativos y de los péptidos AQUA se puede determinar de esta forma la concentración real de la proteína parental en la muestra diagnóstica. En Gerber, Scott A, y col. "Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS" PNAS, 10 de Junio de 2003. Vol 100. No 12. p 6940-6945 se proporcionan procedimientos generales de cuantificación absoluta.

15 **[0069]** Alternativamente, se pueden detectar anticuerpos para proteínas marcadoras en una muestra del paciente, usando proteínas marcadoras o sus fragmentos como agente de detección, por ejemplo en un ELISA. Se puede detectar una concentración alterada de proteínas marcadoras detectando la presencia o una cantidad alterada de autoanticuerpos contra ellas, en comparación con el nivel de autoanticuerpos en una muestra control. El nivel de autoanticuerpos se puede detectar mediante transferencia de Western (en una electroforesis 1D o 2D)
20 contra un tejido de riñón obtenido por biopsia o extracción quirúrgica, o líneas celulares derivadas de riñón crecidas *in vitro*, o por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), biochips de proteínas o biochip de cuentas en suspensión usando proteínas purificadas.

[0070] A modo de ejemplo, la detección de autoanticuerpos para proteínas incrementadas de manera
25 diferencial en pacientes con daño renal y/o con rechazo de riñón se puede llevar a cabo de la manera siguiente. Las proteínas recombinantes se expresan en células de insecto infectadas con baculovirus y usadas para recubrir la superficie de placas de microtitulación. Una muestra procedente de pacientes de los que se sospecha que presentan daño renal y/o rechazo de riñón se añade a pocillos duplicados de cada placa de microtitulación y se incuba a 37°C durante 1 hora. Las placas se aspiran y se lavan antes de la adición de un antisuero de IgG dirigida contra seres
30 humanos marcada con peroxidasa de rábano (HRP) y se incuba durante 1 hora a 37°C. Por último, la unión del antisuero dirigido contra seres humanos se revela aspirando las placas, lavando, y añadiendo tetrametilbencidina (TMB) que en presencia de HRP produce un producto coloreado cuya intensidad se mide leyendo las placas a 450 nm. Un grupo de placas idénticas se somete a pruebas con la excepción de que el segundo anticuerpo es antisuero de IgM dirigida contra seres humanos marcada con HRP. Los niveles de anticuerpos IgG y/o IgM para cada una de
35 las proteínas marcadoras de daño renal y/o rechazo de riñón se encuentran alterados cuando se comparan con los niveles encontrados en muestras procedentes de individuos sanos.

[0071] Dentro de la invención se contempla el uso (i) de un biochip de anticuerpos o conjunto de chips, o un biochip de cuentas en suspensión capaz de detectar una o más proteínas que interaccionan con ese anticuerpo; o
40 (ii) un biochip de proteínas o un conjunto de chips, o un biochip de cuentas en suspensión capaz de detectar uno o más autoanticuerpos que interaccionan con las proteínas marcadoras; o (iii) una combinación de ambos biochips de anticuerpos y biochips de proteínas.

[0072] Un "chip de anticuerpos" o "biochip de anticuerpos" es un biochip de elementos únicos direccionables
45 sobre una superficie sólida continua mediante la cual en cada elemento único direccionable se inmoviliza un anticuerpo con especificidad definida para un antígeno de manera que permite la captura posterior del antígeno diana y la subsiguiente detección del grado de dicha unión. Cada elemento único direccionable está separado de los demás elementos únicos direccionables sobre la superficie sólida de manera que la unión y detección de los antígenos específicos no interfiera con ninguno de dichos elementos únicos direccionables adyacentes.
50

[0073] Un "biochip de cuentas en suspensión" es una suspensión acuosa de una o más partículas distintas identificables en la que cada partícula contiene características codificantes en relación a su tamaño y color o firma fluorescente y en las que todas las cuentas de una combinación particular de dichas características codificantes se recubren con un anticuerpo con una especificidad definida por un antígeno de una manera que permite la captura
55 posterior del antígeno diana y la subsiguiente detección del grado de dicha unión. Ejemplos de dichos biochips se pueden encontrar en www.luminexcorp.com donde se describe la aplicación del biochip de cuentas en suspensión XMAP® sobre el sistema Luminex® 100™.

[0074] Alternativamente, se puede usar la expresión diferencial de ácidos nucleicos que codifican proteínas

marcadoras como procedimiento de detección. La expresión de los ácidos nucleicos se puede detectar mediante procedimientos conocidos en la materia, tales como RT-PCR, transferencia de Northern o hibridación *in situ* como FISH.

5 **[0075]** El diagnóstico se puede basar en la expresión diferencial de uno, dos, tres o más proteínas marcadoras, o uno, dos, tres o más autoanticuerpos generados contra dichas proteínas, o una combinación de ambos. Además, puede ser parte de un diagnóstico más amplio en el que se diagnostican dos o más enfermedades diferentes. El daño renal y el rechazo de trasplante de riñón se pueden diagnosticar junto con al menos otra enfermedad, que puede o puede no ser una enfermedad renal, en la misma muestra de tejido corporal, mediante un
10 procedimiento que incluye la detección de un cambio en la concentración de otra proteína en la muestra diagnóstica, comparada con una muestra de un sujeto humano normal control. Estas otras enfermedad(es) pueden ser cualquiera de las que se pueden diagnosticar en un tejido corporal.

Diagnóstico y pronóstico

15 **[0076]** El término "diagnóstico", como se usa en el presente documento, incluye el suministro de cualquier información concerniente a la existencia, no existencia o probabilidad de daño renal, enfermedad o rechazo del trasplante de riñón en un paciente. Además incluye el suministro de información concerniente al tipo o clasificación del trastorno o de los síntomas que se producen o que se pueden experimentar en relación a él. Incluye el
20 pronóstico de la evolución clínica de la dolencia.

[0077] Los procedimientos descritos en el presente documento son útiles tanto para el diagnóstico como para el pronóstico de daño renal, incluyendo rechazo crónico de trasplante de riñón. El daño o rechazo renal se puede constatar si uno o más marcadores están presentes a una concentración aumentada o reducida. Para algunos
25 marcadores, tanto una concentración aumentada como reducida puede ser indicativa de daño o rechazo.

[0078] La invención se puede usar para determinar la fase de progresión del daño renal incluyendo el rechazo de trasplante de riñón, si se desea, con referencia a resultados obtenidos previamente del mismo paciente o por referencia a valores normales que se consideran típicos de la fase de la enfermedad. De esta forma, la invención se
30 puede usar a determinar si, por ejemplo, después del tratamiento del paciente con un fármaco o fármaco candidato, la enfermedad ha progresado o no. El resultado puede dar lugar al pronóstico del desenlace de la enfermedad.

[0079] Los procedimientos normalmente emplean una muestra biológica procedente de un paciente tal como sangre, suero, tejido, plasma, orina u otros fluidos corporales adecuados. Una muestra preferida de un paciente es
35 sangre o productos sanguíneos tales como suero o plasma. El plasma u otros fluidos de muestras se pueden limpiar de proteínas muy abundantes antes de la prueba, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, la muestra diagnóstica puede ser una sección de tejido que se fija, por ejemplo, por congelación o embebiéndola en parafina.

[0080] Los procedimientos diagnósticos y usos de la invención pueden comprender las etapas de (i) detección de la expresión de la proteína marcadora, ácido nucleico o anticuerpo en una muestra o muestras de prueba, (ii) detección de la expresión de la proteína marcadora, ácido nucleico o anticuerpo en una muestra o muestras control, y (iii) comparación del nivel de expresión entre las muestras control y de prueba para establecer si el marcador se expresa de manera diferencial en la muestra de prueba. Alternativamente, se puede usar un control previamente existente para su comparación. Preferentemente, la muestra control procede del mismo tipo de tejido o tipo de fluido
45 corporal que la muestra de prueba.

[0081] En general, el término "control" se refiere a un sujeto humano normal, es decir, uno que no padezca de daño renal, o a tejido sano del propio sujeto de la muestra diagnóstica. En algunos casos, particularmente cuando las fases de rechazo de trasplante de riñón se controlan progresivamente, o cuando se está controlando la evolución
50 del tratamiento, en su lugar se puede realizar una comparación con la concentración previamente observada en el mismo sujeto en una fase de progresión más temprana de la enfermedad, o en un punto de tiempo anterior.

[0082] La etapa de comparación con una muestra control puede no ser siempre necesaria, puesto que en muchos casos será obvio para el facultativo experto que la concentración es anormalmente alta o baja.
55

[0083] "Expresión diferencial", como se usa anteriormente, se refiere a al menos una diferencia reconocible en la expresión de una proteína o de un ácido nucleico. Puede ser una diferencia medible cuantitativamente, estimable semi-cuantitativamente o detectable cualitativamente en la expresión del tejido o fluido corporal. Así, una proteína o un ácido nucleico expresado de manera diferencial se puede expresar intensamente en tejido o en fluido corporal en

estado normal y se puede expresar menos intensamente o no expresarse en absoluto en estado patológico. Por el contrario, se puede expresar intensamente en tejido o fluido corporal en estado patológico y se puede expresar menos intensamente o no expresarse en absoluto en estado normal. Además, la expresión se puede considerar diferencial si la proteína o el ácido nucleico experimentan algún cambio reconocible entre los dos estados comparados.

[0084] Las muestras se pueden tomar diaria, semanal, mensual o bimensualmente después del trasplante. Las muestras diarias o semanales pueden ser apropiadas para la detección del rechazo agudo, mientras que las muestras mensuales o bimensuales son más apropiadas para la detección del rechazo crónico.

10

Tratamiento

[0085] Se entenderá que en lo que se refiere al tratamiento, éste incluye cualquier medida adoptada por el facultativo para aliviar el efecto del daño o rechazo de trasplante de riñón en un paciente. Así, aunque la reversión del daño o la eliminación del daño o de los efectos del rechazo es un objetivo deseable, el tratamiento efectivo también incluirá cualquier medida capaz de conseguir la reducción del grado de daño o gravedad de los efectos.

[0086] En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de tratamiento mediante el uso de un agente que restituirá la expresión de una o más proteínas expresadas de manera diferencial en el estado de daño renal y/o rechazo del trasplante de riñón a la que se da en el estado normal con el fin de prevenir el desarrollo o la progresión del daño renal y/o rechazo de trasplante del órgano. Preferentemente, la expresión de la proteína se restituye al nivel del estado normal.

[0087] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento en el que se usa el patrón de proteínas expresadas de manera diferencial en una muestra procedente de un individuo con daño renal y/o rechazo de trasplante de riñón para predecir la terapia más efectiva y más apropiada para aliviar el daño renal y/o el rechazo de trasplante de riñón.

Procedimientos de ensayo

30

[0088] También se proporciona un procedimiento de selección de un agente para determinar su utilidad en el tratamiento del daño renal y/o rechazo de trasplante de riñón, el procedimiento que comprende:

(a) la obtención de una muestra procedente, o representativa de, un sujeto que presenta daño renal y/o síntomas de rechazo de trasplante de riñón, que ha sido tratado con el agente a seleccionar;

(b) la determinación de la presencia, ausencia o grado de expresión de una proteína o proteínas marcadoras como se describen en el presente documento en la muestra procedente, o representativa, del sujeto tratado; y,

(c) la selección o el descarte del agente según el grado en el que cambia la expresión, actividad o cantidad de proteína o proteínas marcadoras en el sujeto tratado que presenta daño renal y/o síntomas de rechazo de trasplante de riñón.

[0089] Preferentemente, el agente se selecciona si convierte la expresión de la proteína expresada de manera diferencial al nivel de un sujeto normal. Más preferentemente, el agente se selecciona si convierte la expresión de la proteína o proteínas al nivel del sujeto normal.

[0090] También se proporciona un procedimiento de selección de un agente para determinar su utilidad en el tratamiento del daño renal y/o rechazo del trasplante de riñón, el procedimiento que comprende:

50

(a) la obtención de muestras a lo largo del tiempo procedentes, o representativas, de un sujeto que presenta daño renal y/o síntomas de rechazo de trasplante de riñón, que ha sido tratado con el agente a seleccionar;

(b) la determinación de la presencia, ausencia o grado de expresión de una proteína o proteínas marcadoras como se describe en el presente documento en dichas muestras; y,

(c) la determinación de si el agente afecta al cambio a lo largo del tiempo en la expresión de la proteína marcadora en el sujeto tratado que presenta daño renal y/o síntomas de rechazo de trasplante de riñón.

[0091] Las muestras obtenidas a lo largo del tiempo se pueden extraer en intervalos de semanas, meses o años. Por ejemplo, las muestras se pueden extraer en intervalos de un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, seis meses, ocho meses o 12 meses.

5 **[0092]** Un cambio en la expresión a lo largo del tiempo puede ser un incremento o una reducción en la expresión, comparado con el nivel de expresión inicial en muestras procedentes del sujeto y/o comparado con el nivel de expresión en muestras procedentes de sujetos normales. El agente se selecciona si reduce o detiene el cambio de la expresión a lo largo del tiempo.

10 **[0093]** En los procedimientos de selección descritos anteriormente, los sujetos que tienen niveles diferenciales de expresión de proteínas comprenden:

(a) sujetos normales y sujetos que presentan daño renal y/o síntomas de rechazo de trasplante de riñón; y,

15 (b) sujetos que presentan daño renal y/o síntomas de rechazo de trasplante de riñón que no han sido tratados con el agente y sujetos que presentan daño renal y/o síntomas de rechazo de trasplante de riñón que han sido tratados con el agente.

Composiciones

20

[0094] Los marcadores o anticuerpos contra ellos descritos en el presente documento se pueden formular en composiciones, en particular en composiciones terapéuticas. La preparación de composiciones terapéuticas que contienen polipéptidos o proteínas como principios activos es bien conocida la materia. También se pueden preparar composiciones terapéuticas que pueden ser disoluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para su disolución o suspensión en un líquido antes de su ingestión. La composición terapéutica también puede estar emulsionada. El principio activo terapéutico normalmente se mezcla con vehículos orgánicos y/o inorgánicos que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Los vehículos normalmente son excipientes fisiológicamente aceptables que comprenden más o menos sustancias inertes cuando se añaden a la composición terapéutica para conferir una consistencia y una forma adecuadas a la composición. Los vehículos adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, y similares y sus combinaciones. Además, si se desea la composición puede contener pequeñas cantidades de sustancias auxiliares tales como agentes edulcorantes o emulsionantes y agentes tamponantes del pH que potencian la eficacia del principio activo. También están contempladas composiciones terapéuticas que contienen vehículos que tienen valor nutricional.

35 **[0095]** Una composición se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, simultánea o secuencialmente, dependiendo de la dolencia a tratar.

[0096] Las composiciones líquidas farmacéuticamente administrables se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo, dispersando, etc., una proteína de fusión de la invención y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un vehículo, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, y similares, para así formar una disolución o suspensión. Si se desea, la composición a administrar también puede contener sustancias auxiliares tales como agentes tamponantes del pH y similares. Los procedimientos concretos de preparación de dichas formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en la materia; por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

45

Administración

[0097] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de diversas formas dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y de la zona a tratar. La administración puede ser por vía tópica (incluyendo oftálmica, vaginal, rectal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración por vía parenteral incluye gotero intravenoso, inyección subcutánea, intraperitoneal o intramuscular, administración pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación, o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. Para la administración por vía oral, se ha encontrado que los oligonucleótidos con al menos un ribonucleótido 2'-sustituido son particularmente útiles debido a sus características de absorción y distribución. Patente de EE.UU. N° 5.591.721 expedida a Agrawal y col. Los oligonucleótidos con al menos una modificación 2'-O-metoxietilo se cree que son particularmente útiles para la administración por vía oral.

[0098] Cuando una composición como la descrita en el presente documento se deba administrar a un individuo, la administración se realiza preferentemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad

terapéuticamente eficaz" (según sea el caso, aunque la profilaxis se puede considerar terapia), siendo esto suficiente para demostrar beneficios al individuo.

[0099] La administración puede ser, por ejemplo, diaria, semanal o mensualmente. La cantidad real administrada, y la velocidad y evolución temporal de la administración dependerá de la naturaleza y la gravedad de la dolencia a tratar. También dependerá de la toxicidad del agente terapéutico, según se determina mediante ensayos preclínicos y ensayos clínicos. La prescripción del tratamiento, por ejemplo decisiones sobre la dosificación, etc., entra dentro de las responsabilidades de facultativos generales y otros expertos médicos.

10 Dosificación

[0100] La dosificación depende de la gravedad y la respuesta de la dolencia a tratar, con una evolución del tratamiento que dura entre varios días y varios meses o hasta que se produzca una reducción de los títulos víricos (medidos de manera rutinaria mediante transferencia de Western, ELISA, RT-PCR, o transferencia de ARN (Northern), por ejemplo), o se consiga una disminución del estado patológico. Los calendarios de dosificación óptimos se calculan fácilmente a partir de mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo. Las personas con conocimientos ordinarios pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición.

[0101] Las cantidades terapéutica o profilácticamente eficaces (dosificaciones) pueden variar dependiendo de la potencia relativa de las composiciones individuales, y en general se pueden determinar de manera rutinaria basándose en el peso molecular y las CE_{50} en estudios *in vitro* y/o en animales. Por ejemplo, dado el peso molecular de un compuesto farmacológico (obtenido a partir de una secuencia de oligonucleótidos y la estructura química) y una dosis eficaz obtenida experimentalmente, como una CI_{50} , por ejemplo, se calcula una dosis en mg/kg de manera rutinaria. En general, la dosificación se encuentra entre 0,001 μ g y 100 g y se puede administrar en una o varias veces a diario, semanal, mensual o anualmente, o incluso cada 2 a 20 años.

Ácidos nucleicos

[0102] Naturalmente los ácidos nucleicos pueden ser de doble cadena o de cadena sencilla, ADNc o ADN genómico, o ARN. Los ácidos nucleicos pueden ser completa o parcialmente sintéticos, dependiendo del diseño. Obviamente, la persona experta entenderá que cuando el ácido nucleico según la invención incluya ARN, la referencia a la secuencia mostrada se debe interpretar como una referencia al equivalente del ARN, con el U sustituido por T. La presente invención también engloba el producto de expresión de cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos descritas y los procedimientos de preparación del producto de expresión mediante la expresión a partir de ácidos nucleicos codificantes en condiciones adecuadas en células hospedadoras apropiadas.

[0103] En *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel y col. eds., Wiley, 1994, y en el sumario de *Short Protocols in Molecular Biology*, Quinta Edición, Ausubel y col. eds., *Current Protocols*, 2002, se describen con detalle numerosas técnicas y protocolos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas.

Anticuerpos

[0104] Los anticuerpos contra las proteínas marcadoras descritos en el presente documento se pueden producir usando procedimientos conocidos. Estos procedimientos de producción de anticuerpos incluyen la inmunización de un mamífero (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, caballo, cabra, oveja o mono) con la proteína. Los anticuerpos se pueden obtener de los animales inmunizados usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la materia, y se pueden seleccionar, preferentemente usando la unión del anticuerpo al antígeno de interés. El aislamiento de anticuerpos y/o células que producen anticuerpos a partir de un animal puede estar acompañado por una etapa de sacrificio del animal.

[0105] Como alternativa o suplemento a la inmunización de un mamífero con una proteína, se puede obtener un anticuerpo específico para la proteína a partir de una librería producida de manera recombinante de dominios variables de la inmunoglobulina expresada, por ejemplo, usando el bacteriófago lambda o el bacteriófago filamentoso que presenta dominios de unión de la inmunoglobulina funcionales en su superficie; por ejemplo, véase el documento WO 92/01047. La librería puede ser *naive*, que se construye a partir de secuencias obtenidas de un organismo que no haya sido inmunizado con la proteína, o puede ser una librería construida usando secuencias

obtenidas a partir de un organismo que haya sido expuesto al antígeno de interés.

[0106] Los anticuerpos se pueden unir o se pueden generar contra cualquier estado biológicamente relevante de la proteína. Así, por ejemplo, se puede generar contra la forma no glicosilada de una proteína que exista en el cuerpo en forma glicosilada, contra una forma más madura de una proteína precursora, por ejemplo, menos su secuencia señal, o contra un péptido que porta un epítipo relevante de la proteína marcadora.

[0107] Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, y pueden ser anticuerpos multiespecíficos (incluyendo biespecíficos), quiméricos o humanizados. Los anticuerpos según la presente invención se puede modificar de una serie de formas. De hecho, se debe entender que el término "anticuerpo" cubre cualquier sustancia de unión que tenga un dominio de unión con la especificidad requerida. Así, la invención cubre fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo moléculas sintéticas y moléculas cuya forma mimetiza la de un anticuerpo que permita su unión a un antígeno o epítipo.

[0108] Ejemplos de fragmentos de anticuerpos, capaces de unirse a un antígeno u otro par de unión, son el fragmento Fab que consta de los dominios VL, VH, Cl y CH1; el fragmento Fd que consta de los dominios VH y CH1; el fragmento Fv que consta de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; el fragmento dAb que consta de un dominio VH; regiones CDR aisladas y fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra. También se incluyen fragmentos Fv de cadena sencilla.

[0109] Los fragmentos de anticuerpo, que reconocen epítopos específicos, se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, pero no están limitados a los fragmentos F(ab')₂ que se pueden producir mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, se pueden construir librerías de expresión de Fab (Huse, y col., 1989, Science 246: 1275-1281) que permitan una identificación fácil y rápida de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

[0110] El término "anticuerpos monoclonales" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que puedan estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante el primer procedimiento descrito por Kohler y Milstein, Nature, 256:495, 1975 o se pueden preparar mediante procedimientos recombinantes, véase Cabilly y col., patente de EE.UU. Nº 4.816.567, o Mage y Lamoyi en Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas 79-97, Marcel Dekker Inc., Nueva York, 1987.

[0111] En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado se inmuniza con el antígeno por vía subcutánea, intraperitoneal o intramuscular para activar los linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a las nanopartículas usadas para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente fusionante adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma, véase Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986).

[0112] Las células de hibridoma preparadas de esta forma se pueden sembrar y crecer en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o supervivencia de las células parentales de mieloma no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales de mieloma carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

[0113] Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan un nivel de expresión de anticuerpo elevado y estable por parte de las células seleccionadas productoras de anticuerpo, y son sensibles al medio, tal como el medio HAT.

[0114] El medio de cultivo en el que se crecen las células de hibridoma se somete a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína. Preferentemente, la especificidad de unión se determina mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los anticuerpos monoclonales de la invención son aquellos que se unen específicamente a la proteína.

[0115] En una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo monoclonal tendrá una afinidad que es mayor que la afinidad micromolar o superior (es decir, una afinidad superior a 10^{-6} mol) según se determina, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard, véase Munson & Pollard, Anal. Biochem., 107:220, 1980.

5 **[0116]** Después de que se identifique que las células de hibridoma producen anticuerpos neutralizantes de la especificidad y afinidad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y crecimiento por metodología estándar. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen el Medio Eagle modificado de Dulbecco o el medio RPM1-1640.

10 **[0117]** Además, las células de hibridoma se pueden crecer *in vivo* en forma de tumores de ascitos en un animal.

[0118] Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones se separan de manera conveniente del medio de cultivo, del fluido de ascitos, o del suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas
15 convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

[0119] El ácido nucleico que codifica anticuerpos monoclonales de la invención se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos muy conocidos en la materia, por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos
20 que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligera y pesada de anticuerpos murinos. Las células de hibridoma de la invención son una fuente preferida de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o sus fragmentos. Una vez aislado, el ácido nucleico se liga en vectores de expresión o clonación, que a continuación se transfectan en células hospedadoras, que se pueden cultivar de manera que los anticuerpos monoclonales se produzcan en el cultivo de células hospedadoras recombinantes.

25 **[0120]** Un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal según la presente invención se puede someter a mutación genética u otros cambios. Además, aquellos expertos en la materia comprenderán que un anticuerpo monoclonal se puede someter a técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos, anticuerpos humanizados o moléculas quiméricas que retengan la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden suponer la introducción de ADN que codifica la región variable de la inmunoglobulina, o las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), de un anticuerpo en las regiones constantes, o regiones constantes más las regiones marco, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0184187 A, GB 2188638 A o EP 0239400 A. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en los documentos EP 0120694 A y EP 0125023 A.
30

35 **[0121]** Un anticuerpo contra una proteína marcadora descrito en el presente documento se unirá a dicha proteína. Preferentemente, dicho anticuerpo se une específicamente a dicha proteína. Por "específico" se quiere decir que el anticuerpo se une a dicha proteína con una afinidad significativamente superior a la que presenta por otras moléculas.
40

[0122] Ahora se describirá la invención con más detalle en referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan sólo con fines ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

Parte experimental

45 **[0123]** Con el fin de descubrir nuevos biomarcadores candidatos para el rechazo de aloinjerto renal, se analizaron mediante proteómica de expresión 240 muestras de suero de receptores de trasplantes de riñón procedentes del Centro de trasplante de Oxford. Estas muestras de suero de alta calidad se limpiaron de seis proteínas muy abundantes y se analizaron por electroforesis 2D. El análisis de la imagen y la huella dactilar de la masa del péptido (PMF) de la mitad de las muestras de suero dio como resultado un grupo de 29 proteínas reguladas, 20 de las cuales están relacionadas con la respuesta inmunitaria e inflamatoria, así como otros procesos durante el rechazo del riñón o la enfermedad renal. Las 9 proteínas restantes no habían sido descritas en el contexto del rechazo de riñón o la enfermedad renal hasta la fecha. Un grupo de 16 proteínas del total de 29 proteínas reguladas puede servir como indicadores independientes para el rechazo de aloinjerto de riñón. Estos hallazgos se
50 confirmaron con un estudio de validación realizado con la segunda mitad de las muestras de suero.
55

Procedimientos

Muestras de suero de rechazo de riñón

5 **[0124]** Se recibieron 240 muestras de suero procedentes del Centro de trasplantes de Oxford. 120 muestras de suero de enfermedad procedían de 40 receptores de trasplantes de riñón con biopsia que presenta nefropatía crónica del aloinjerto (NCA) y otras 120 muestras de suero control procedían de 40 receptores con un injerto funcional sin evidencia de NCA, con tres puntos de tiempo diferentes en cada una. La clasificación de las muestras se presenta en la Tabla 1 y 2.

10

Tabla 1. Clasificación de las muestras de suero de enfermedad de rechazo de riñón.

Punto de tiempo	Descripción	Nº de las muestras de enfermedad
Tiempo 1	Pre-trasplante, próximo al momento del trasplante	1-1 a 40-1
Tiempo 2	Antes del desarrollo de NCA, pero en un momento en el que pueden estar en circulación mediadores potenciales del proceso (en general al 1 año del trasplante). Si se puede diagnosticar NCA en el primer año, entonces el suero se selecciona en un momento adecuado dentro del primer año.	1-2 a 40-2
Tiempo 3	Tan próximo como sea posible al momento del diagnóstico de la biopsia de NCA	1-3 a 40-3

Tabla 2. Clasificación de las muestras de suero control de rechazo de riñón.

Punto de tiempo	Descripción	Nº de las muestras control
Tiempo 1	Pre-trasplante, próximo al momento del trasplante	41-1 a 80-1
Tiempo 2	Aproximadamente 1 año después del trasplante	41-2 a 80-2
Tiempo 3	Aproximadamente 3 años después del trasplante	41-3 a 80-3

15 **[0125]** Las muestras se dividieron en dos grupos: grupo de estudio y grupo de validación. Cada grupo contenía muestras procedentes de 20 pacientes enfermos y 20 pacientes control (tres puntos de tiempo diferentes en cada uno) y se seleccionaron de manera aleatoria. Para la clasificación de las muestras, véase, la Tabla 3 y 4.

Tabla 3. Clasificación de las muestras de suero de rechazo de riñón para el grupo de estudio

Enfermedad-1	Enfermedad-2	Enfermedad-3	Control-1	Control-2	Control-3
1	-1	1	-2	1	-3
5	-1	5	-2	5	-3
8	-1	8	-2	8	-3
12	-1	12	-2	12	-3
15	-1	15	-2	15	-3
16	-1	16	-2	16	-3
17	-1	17	-2	17	-3
18	-1	18	-2	18	-3
19	-1	19	-2	19	-3
20	-1	20	-2	20	-3
21	-1	21	-2	21	-3
22	-1	22	-2	22	-3
23	-1	23	-2	23	-3
24	-1	24	-2	24	-3
26	-1	26	-2	26	-3
28	-1	28	-2	28	-3
29	-1	29	-2	29	-3
30	-1	30	-2	30	-3
35	-1	35	-2	35	-3
39	-1	39	-2	39	-3
				41	-1
				41	-2
				41	-3
				42	-1
				42	-2
				42	-3
				45	-1
				45	-2
				45	-3
				47	-1
				47	-2
				47	-3
				50	-1
				50	-2
				50	-3
				51	-1
				51	-2
				51	-3
				53	-1
				53	-2
				53	-3
				54	-1
				54	-2
				54	-3
				58	-1
				58	-2
				58	-3
				59	-1
				59	-2
				59	-3
				64	-1
				64	-2
				64	-3
				65	-1
				65	-2
				65	-3
				68	-1
				68	-2
				68	-3
				69	-1
				69	-2
				69	-3
				70	-1
				70	-2
				70	-3
				71	-1
				71	-2
				71	-3
				76	-1
				76	-2
				76	-3
				78	-1
				78	-2
				78	-3
				79	-1
				79	-2
				79	-3
				80	-1
				80	-2
				80	-3

20

Tabla 3. Clasificación de las muestras de suero de rechazo de riñón para el grupo de validación

Enfermedad-1		Enfermedad-2		Enfermedad-3		Control-1		Control-2		Control-3	
2	-1	2	-2	2	-3	43	-1	43	-2	43	-3
3	-1	3	-2	3	-3	44	-1	44	-2	44	-3
4	-1	4	-2	4	-3	46	-1	46	-2	46	-3
6	-1	6	-2	6	-3	48	-1	48	-2	48	-3
7	-1	7	-2	7	-3	49	-1	49	-2	49	-3
9	-1	9	-2	9	-3	52	-1	52	-2	52	-3
10	-1	10	-2	10	-3	55	-1	55	-2	55	-3
11	-1	11	-2	11	-3	56	-1	56	-2	56	-3
13	-1	13	-2	13	-3	57	-1	57	-2	57	-3
14	-1	14	-2	14	-3	60	-1	60	-2	60	-3
25	-1	25	-2	25	-3	61	-1	61	-2	61	-3
27	-1	27	-2	27	-3	62	-1	62	-2	62	-3
31	-1	31	-2	31	-3	63	-1	63	-2	63	-3
32	-1	32	-2	32	-3	66	-1	66	-2	66	-3
33	-1	33	-2	33	-3	67	-1	67	-2	67	-3
34	-1	34	-2	34	-3	72	-1	72	-2	72	-3
36	-1	36	-2	36	-3	73	-1	73	-2	73	-3
37	-1	37	-2	37	-3	74	-1	74	-2	74	-3
38	-1	38	-2	38	-3	75	-1	75	-2	75	-3
40	-1	40	-2	40	-3	77	-1	77	-2	77	-3

Diseño del estudio

5

[0126] Se llevaron a cabo dos tipos de análisis de la imagen: (1) el estudio de la evolución temporal de los pacientes control y enfermos y (2) pacientes control frente a pacientes enfermos. Se compararon de la manera siguiente los geles 2D de muestras del grupo de estudio:

10

enfermedad-1 vs. enfermedad-3, control-1 vs. control-3,
 enfermedad-1 vs. control-1, enfermedad-3 vs. control-3
 enfermedad-1 vs. enfermedad-2, enfermedad-2 vs. enfermedad-3,
 control-1 vs. control-2, control-2 vs. control-3.

15 **[0127]**

De nuevo, los números 1, 2 y 3 hacen referencia a los tres puntos de tiempo diferentes en los que se tomaron las muestras. A continuación, se comparó el resultado de los geles 2D analíticos del grupo de validación con la del grupo de estudio para validar los puntos de la proteína regulada y los posibles biomarcadores candidatos del grupo de estudio. Para los geles 2D preparativos, se juntaron de 6 a 7 muestras de suero de enfermedad y muestras control del grupo de estudio y del grupo de validación, respectivamente.

20

Procedimiento proteómico

[0128] El procedimiento proteómico se llevó a cabo según los procedimientos habituales de Proteome Sciences R&D. Resumiendo, 240 muestras de suero de rechazo de riñón se limpiaron de seis proteínas muy abundantes por medio de la columna MARS (sistema de eliminación de afinidad múltiple) (Agilent). Las muestras de suero limpiadas (100 µg) se analizaron por 2-DE analítica (pH 3-10NL, SDS-PAGE al 10%). Los geles 2D analíticos teñidos con plata se analizaron cuantitativamente mediante el *software* Progenesis (v2005) que incluye la detección de puntos, concordancias, eliminación del ruido y normalización. Después de la detección y la concordancia de los puntos de proteínas, los datos de los puntos se exportaron a una Tabla de MS Excel y se usó una macro desarrollada por nosotros para calcular el coeficiente de variación (CV%), la prueba de Mann-Whitney y el factor de regulación. Los puntos regulados se identificaron con los siguientes criterios de selección: los puntos se deben encontrar en al menos el 60% de todos los geles de un grupo, la regulación en exceso/defecto de al menos 1,5 veces o como máximo 0,667 veces y un valor de significación de $p < 0,005$. Con el fin de identificar las proteínas correspondientes, se seleccionaron puntos regulados de geles 2D preparativos teñidos con CBB de muestras de enfermedad limpiadas y control (350 µg, de 6 a 7 muestras individuales cada uno) y se tripsinizaron por medio de la estación de trabajo Punto Handling Workstation (GE Healthcare). Los péptidos resultantes se analizaron por MALDI-MS. Las proteínas se identificaron comparando los espectros de MALDI-MS obtenidos con digestiones de proteínas

realizadas por simulación computacional obtenidas de bases de datos (PMF, huellas dactilares de la masa de péptidos).

Resultados

5

Identificación de proteínas reguladas

[0129] La identificación de los puntos de proteínas reguladas se muestra en la Tabla 4 y Tabla 5. Los histogramas de la evolución temporal de las regulaciones de la proteína procedentes de muestras de enfermedad y control de los puntos de tiempo 1, 2 y 3 se presentan en el suplemento B.

Tabla 4. Identificación de puntos de proteínas reguladas en el grupo de estudio/grupo de validación

Nº del punto	Nombre de la proteína	Nº de Acc. Swiss-Prot	Nº de Acc. EMBL	Comparación de la relación de expresión o tendencia de la regulación			
				C1 vs. C3	D1 vs. D3	C1 vs. D1	C3 vs. D3
61	Precursor del plasminógeno	P00747	X17115	1,76/1,14	+	+	-
210	Región C de la cadena I μ	P01871		3,72/2,32	+	-	-
213	Región C de la cadena I μ	P01871	X17115	3,75/2,35	+	+	-
214	Región C de la cadena I μ	P01871	X17115	3,12/2,01	+	-	-
246	Precursor de la cadena α de la proteína de unión a C4b	M31452; BC02231 2	M31452 BC02231 2	+	+	+	1,86/0,8 4
272	Precursor del cofactor II de la heparina	P05546	M12849; X03498	+	-	1,52/0,8 1	+
286	Precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	Q96PD5	AF38485 6	+	-	2,1 7/0,8 6	+
291	Precursor C9 del componente del complemento, cadena a o b	P02748 K02766	BC02072 1; K02766	+	-	1,51/1,5 0	
445	Precursor I de la glicoproteína β 2 (Apolipoproteína H)	P02749	X58100; X53595; X57847; M62839; S80305; BC02070 3; BC02628 3	0,46/0,53	+	-	+
453	Precursor del subcomponente C1R del complemento, cadena pesada	P00736		0,41/0,65	-	-	-
	Precursor I de la		Véase				

ES 2 379 430 T3

	glicoproteína β2 (Apolipoproteína H)		más arriba				
461		P02749		0, 22/0,40	-	-	+
	Precursor I de la glicoproteína β2 (Apolipoproteína H)		Véase más arriba				
466		P02749		0, 42/0,59	+	-	+
	Precursor del factor pigmentario derivado del epitelio		M76979; AF40044 2				
553		P39955		0,45/0,96	-	-	+
			AF40342 8; BC03438				
	Precursor de la glicoproteína α2 rica en leucinas		9; BC07019- 8			4,39/1,4	
555		P02750			+	-	0
	Precursor del factor pigmentario derivado del epitelio		Véase más arriba				
557		P36955		0,51/0,98	-	-	+
	Precursor del factor pigmentario derivado del epitelio		Véase más arriba				
559		P36955		0,62/0,96	-	-	+
	Precursor del factor pigmentario derivado del epitelio		Véase más arriba				
563		P36955		0,33/0,55	-	-	+
	Precursor del factor pigmentario derivado del epitelio		Véase más arriba				
570		P36955		0,32/0,69	-	-	2,11/0,9 1
591	Precursor C3 del complemento	P01024	K02765	-	+	0,43/0,5 7	+
712	Precursor de la transtiretina, syn: Prealbúmina	P02766		0,37/0,64	0,31/0,27	+	+
722	Precursor de la proteína AMBP	P02760	X04225	0,16/0,16	+	-	4,92/2,8 9
	contiene: microglobulina α1						
728	Precursor de la proteína AMBP (microglobulina α1)	P02760	X04225	0,04/0,04	0,24/0,32	+	7,72/9,7 9
	Precursor de la proteína AMBP (microglobulina α1)		X04225				
730		P02760		0,07/0,64	0,37/0,21	+	6,55/4,3 6
	Precursor de la proteína AMBP (microglobulina α1)		X04225				
734		P02760		0,14/0,16	0,54/0,33	+	3,82 /2,0 2
	Precursor de la proteína AMBP (microglobulina		X04225				
							3,40/2,5

ES 2 379 430 T3

735	α1)	P02760		0,23/0,04	-	-	0
	Precursor de la proteína AMBP (microglobulina α1)		X04225				
741		P02760		0,44/0,57	0,29/0,56	+	-
			D45371				6,89/4,2
742	Adiponectina	Q15848		-	+	-	2
	Precursor de la proteína 2 relacionada con el factor H del complemento						
760		P36980		0,20/0,44	-	-	+
	Precursor C3 del complemento, cadena α		K02765				
771		P01024		-	0,43/0,54	+	-
	Precursor C3 del complemento, cadena α		K02765				
781		P01024		0,51/0,75	-	-	-
781	Precursor C4 del complemento, ácido o básico	P01028		0,51/0,75	-	-	-
	Precursor del factor D del complemento						
			M84526				
785		P00746		0,31/0,56	0,53/0,54	-	+
	Precursor del factor D del complemento		M84526				
786		P00746		-	0,18/0,21	-	+
	Precursor de la proteína plasmática de unión al retinol		X00129; BC02063				
825		P02753	3	0,26/0,40	-	+	+
	Precursor de la proteína plasmática de unión al retinol		Véase más arriba				
826		P02753		0,27/0,18	0,33/0,47	+	+
	Precursor I de la glicoproteína β2 (Apolipoproteína H)		Véase más arriba				
847		P02749	0,39/0,71	-	-	+	
Nº de puntos regulados por exceso							
			4			-	9
Nº de puntos regulados por defecto							
			22			9	-
Nº de puntos totales regulados							
			26			9	9

Tabla 5. Identificación de puntos de proteínas reguladas en el grupo de estudio.

Nº del punto	Nombre de la proteína	Nº de Acc. Swiss-Prot/[EMB L]	Comparación de la relación de expresión			
			C1 vs. C2	C2 vs. C3	D1 vs. D2	D2 vs. D3
		P00450				
		[M13699;				
56	Precursor de la ceruloplasmina (Ferroxidasa)	M13536]		--	--	1,53
67	Precursor del plasminógeno		1,74	--	1,74	--
113	Precursor del factor B del complemento	P00751	--	--	2,02	--
149	Precursor de la macroglobulina α2	P01023	--	--	1,68	--

150	Precursor de la macroglobulina α 2	P01023	--	--	1,97	--
226	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA PROTEÍNA		--	--	--	2,59
232	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA PROTEÍNA		--	--	--	0,35
238	Precursor H1 de la cadena pesada del inhibidor de la inter- α -tripsina	P19827	--	--	--	0,31
242	Precursor H1 de la cadena pesada del inhibidor de la inter- α -tripsina	P19827	--	--	--	0,24
243	Precursor H1 de la cadena pesada del inhibidor de la inter- α -tripsina	P19827	--	--	4,09	0,12
249	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA PROTEÍNA		2,40	--	--	--
288	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA PROTEÍNA		--	--	0,49	--
291	Precursor C9 del componente del complemento	P02748	--	--	0,61	--
352	Precursor de la hemopexina (glicoproteína β 1B)	P02790	--	1,57	--	--
381	Precursor de la hemopexina (glicoproteína β 1B)	P02790	--	0,60	--	--
418	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA PROTEÍNA		--	0,38	--	--
430	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA PROTEÍNA		--	0,31	--	--
442	Precursor del cininógeno-1	P01042	--	0,64	--	--
448	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA PROTEÍNA		--	--	0,57	--
463	Precursor del subcomponente C1R del complemento	P00736	--	--	--	0,31
464	Precursor del subcomponente C1R del complemento	P00736	--	--	20,64	0,04
466	Precursor I de la glicoproteína β 2 (Apolipoproteína H)	P02749	0,31	--	--	--
498	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA PROTEÍNA		--	--	3,20	0,33
510	Precursor de la hemopexina (glicoproteína β 1B)	P02790	--	--	2,02	0,65
515	Precursor de la hemopexina (glicoproteína β 1B)	P02790	--	--	--	0,42
551	Precursor de la hemopexina (glicoproteína β 1B)	P02790	--	--	1,96	--
557	Precursor del factor pigmentario derivado del epitelio	P36955	0,66	--	--	--
562	Precursor de la glicoproteína α 2 rica en leucinas	P02750	--	--	--	2,73
570	Precursor del factor pigmentario derivado del epitelio	P36955	0,54	--	--	--
575	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA PROTEÍNA		--	--	0,27	3,17
599	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA PROTEÍNA		5,65	--	--	--
622	Precursor de la apolipoproteína A-IV	P06727 Q14152	--	--	0,25	2,42
657	Subunidad 10 del factor 3 de iniciación de la traducción en eucariotas	[U58046; U78311]	--	--	--	1,68

657	Precursor de la ceruloplasmina	P00450	--	--	--	1,68
658	Precursor de la ceruloplasmina	P00450	2,97	0,33	--	--
667	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA PROTEÍNA		--	0,14	--	--
672	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA PROTEÍNA		--	--	--	1,88
673	Proteína de 130 kDa rica en leucinas	P42704	--	0,08	--	--
702	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA PROTEÍNA		0,61	--	--	--
711	Precursor C4-A del complemento	P0C0L4	--	--	1,94	--
711	Precursor C4-b del complemento	P0C0L5	--	--	1,94	--
722	Precursor de la proteína AMBP (microglobulina α 1)	P02760	0,36	0,43	0,17	6,28
728	Precursor de la proteína AMBP (microglobulina α 1)	P02760	0,26	0,15	0,06	4,30
730	Precursor de la proteína AMBP (microglobulina α 1)	P02760	0,27	0,24	0,32	--
734	Precursor de la proteína AMBP (microglobulina α 1)	P02760	0,46	0,31	0,20	2,72
735	Precursor de la proteína AMBP (microglobulina α 1)	P02760	0,40	--	0,27	3,19
771	Precursor C3 del complemento	P01024	--	--	--	0,32
785	Precursor del factor D del complemento	P00746	0,42	--	0,27	--
786	Precursor del factor D del complemento	P00746	0,10	--	0,06	--
825	Precursor de la proteína plasmática de unión al retinol	P02753	--	--	0,27	--
826	Precursor	P02753	0,40	--	0,23	--
849	NO SE ENCONTRÓ NINGUNA PROTEÍNA		--	0,30	--	--
854	Precursor de la glicoproteína α 1B	P04217	--	--	--	1,51
Nº de puntos regulados por exceso			4	1	10	12
Nº de puntos regulados por defecto			12	12	15	10
Nº de puntos totales regulados			16	13	25	22

[0130] Los puntos nº 657, 711 y 781 se asignaron a dos proteínas diferentes (resaltadas en gris). El "número del punto" es el número de punto asignado en el gel de referencia obtenido en Progenesis. La "relación de expresión" es el cociente de los volúmenes promedio normalizados del punto. C1 vs. C2 significa la relación C2/C1 y C1 vs. C3 significa la relación C3/C1. La relación se proporciona para regulaciones estadísticamente significativas con un valor de significación $p < 0,005$. Si la regulación no cumple este valor, la tendencia de la regulación se indica con +/- que significa regulación por exceso/defecto.

[0131] Tomando todas las comparaciones del grupo de estudio en la Tabla 4 y 5 juntas, se identificaron como regulados un total de 73 puntos individuales y un total de 29 proteínas individuales. La relación de expresión se encontraba entre 0,04 y 20,64. La cobertura de proteínas reguladas, es decir, el porcentaje de la secuencia de la proteína primaria que estaba cubierta por los péptidos tripsinizados encontrados por la PMF, fue del 3%-66% con un valor medio del 29%.

15 Validación de los resultados del grupo de estudio con el grupo de validación

[0132] Un grupo independiente de 120 muestras de plasma (grupo de validación) había sido analizado con la misma estrategia. Se comparó la regulación para cada punto que se encontró que estaba regulado en el grupo de estudio (véase Tabla 4 y 5) con el grupo de validación como se presenta en la Tabla 6. La tasa de validación media fue de 74%.

Tabla 6. Número de puntos regulados en el grupo de estudio y el grupo de validación y tasa de validación.

Comparación	Grupo de estudio	Grupo de validación	Tasa de validación [%]
C1 vs. C3	26	20	77
C1 vs. C2	16	13	81
C2 vs. C3	13	7	54
Control (total)	55	40	73
D1 vs. D3	10	10	100
D1 vs. D2	25	19	76
D2 vs. D3	22	12	55
Enfermedad (total)	57	41	72
C1 vs. D1	4	2	50
C3 vs. D3	9	8	89
Inter (total)	13	10	77

5 Funciones y propiedades de las proteínas reguladas.

[0133] A continuación se enumeran las funciones y propiedades de las proteínas identificadas según la base de datos de proteínas Swiss-Prot [1].

10 Proteínas inflamatorias y relacionadas con la inmunidad en orden alfabético

Precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, PGRP2_HUMAN Q96PD5

[0134] Puede desempeñar un papel como limpiador digiriendo el péptidoglicano (PGN) biológicamente activo en fragmentos biológicamente inactivos. No presenta actividad bacteriolítica directa. Se expresa profusamente en hígado e hígado fetal, y se segrega al suero. Se expresa en un mucho menor grado en colon transversal, nódulos linfáticos, corazón, timo, páncreas, colon descendente, estómago y testículos. La isoforma 2 no se detecta en el hígado o en el suero. El PGRP2_HUMAN Q96PD5 está involucrado en la respuesta inmunitaria.

20 **Precursor de la cadena α de la proteína de unión a C4b, C4BP_HUMAN P04003**

[0135] Controla la vía clásica de activación del complemento. Se une como cofactor al inactivador C3b/C4b (C3bINA), que a continuación hidroliza el fragmento C4b del complemento. También acelera la degradación del complejo C4bC2a (C3 convertasa) disociando el fragmento C2a del complemento. La cadena alfa se une a C4b. También interacciona con la proteína anticoagulante S y con el componente P amiloide del suero. Se encuentra en los quilomicrones (grandes partículas lipoproteicas) en el plasma. El C4BP_HUMAN está involucrado en la vía del complemento, que forma parte del sistema inmunitario innato.

30 **Precursor del subcomponente C1R del complemento, C1R_HUMAN P00736**

[0136] La cadena C1r B es una serin-proteasa que se combina con C1q y C1s para formar C1, el primer componente de la vía clásica del sistema del complemento. El C1R_HUMAN es un componente de la vía del complemento. Contiene una cadena pesada y una cadena ligera.

35 **[0137] Precursor C3 del complemento, CO3_HUMAN P01024**

[0138] C3 desempeña un papel central en la activación del sistema del complemento. Su procesamiento por parte de la C3 convertasa es la reacción central tanto en la vía clásica como en la vía alternativa del complemento. Después de la activación C3b se puede unir covalentemente, a través de su tioléster reactivo, a carbohidratos de la superficie celular o agregados inmunitarios. Derivado de la degradación proteolítica del complemento C3, la anafilatoxina C3a es un mediador del proceso inflamatorio local. Induce la contracción del músculo liso, incrementa la permeabilidad vascular y provoca la liberación de histamina de mastocitos y leucocitos basófilos. El CO3_HUMAN está involucrado en la respuesta inflamatoria¹. El procesamiento de CO3_HUMAN con la eliminación de 4 restos de Arg forma dos cadenas, beta y alfa, unidas por un puente disulfuro.

45

Precursor C4 del complemento, CO4A_HUMAN, CO4B_HUMAN P01028

[0139] C4 desempeña un papel central en la activación de la vía clásica del sistema del complemento. Es procesado por el C1 activado que elimina la anafilatoxina C4a de la cadena alfa. El fragmento C4b de la cadena alfa restante es el producto de activación principal y es una subunidad esencial de las enzimas C3 convertasa (C4b2a) y C5 convertasa (C3bC4b2a) de la vía clásica del complemento. Derivado de la degradación proteolítica del complemento C4, la anafilatoxina C4a es un mediador del proceso inflamatorio local. Induce la contracción del músculo liso, incrementa la permeabilidad vascular y provoca la liberación de histamina de mastocitos y leucocitos basófilos. El componente C4 del complemento humano es polimórfico en dos *loci*, C4A y C4B. Se han detectado 13 alelos de C4A y 22 alelos de C4B. El alelo mostrado en el presente documento es C4A4. Los alelos C4A portan los antígenos de Rodgers (Rg) mientras que los alelos C4B portan los antígenos de Chido (Ch) del grupo sanguíneo. Los alotipos C4A reaccionan más rápidamente con el grupo amino de los antígenos peptídicos mientras que los alotipos C4B reaccionan más rápidamente con el grupo hidroxilo de los antígenos carbohidrato. El C04_HUMAN es un componente de la vía del complemento y de la respuesta inflamatoria.

Precursor C9 del componente del complemento, C09_HUMAN P02748

[0140] C09_HUMAN es el componente final del sistema del complemento a añadir en el ensamblaje del complejo de ataque a membrana. Es capaz de penetrar las bicapas lipídicas, formando canales transmembrana. El componente del complejo de ataque a membrana agrupa las glicoproteínas plasmáticas del complemento C5b, C6, C7, C8 y C9 polimérica sobre membranas biológicas. C09_HUMAN es un componente de la vía² alternativa del complemento y el complejo de ataque a membrana³. La trombina escinde el C09_HUMAN para producir C9a y C9b.

Precursor del factor B del complemento, CFAB_HUMAN P00751

[0141] El factor B, que forma parte de la vía alternativa del sistema del complemento es escindido por el factor D en dos fragmentos: Ba y Bb. Bb, una serin-proteasa, se combina a continuación con el factor 3b del complemento para generar la C3 o C5 convertasa. También se lo ha relacionado en la proliferación y diferenciación de linfocitos B preactivados, la difusión rápida de monocitos sanguíneos periféricos, la estimulación de la blastogénesis de linfocitos y la lisis de eritrocitos. Ba inhibe la proliferación de linfocitos B preactivados.

Precursor del factor D del complemento, CFAD_HUMAN P00746

[0142] El factor D escinde al factor B cuando este último se compleja con el factor C3b, activando el complejo C3bbb, que a continuación se convierte en la C3 convertasa de la vía alternativa. Su función es homóloga a la de C1s en la vía clásica. El CFAD_HUMAN está involucrado en la vía alternativa del complemento.

Región C de la cadena I μ , MUC_HUMAN P01871

40 Otras proteínas en orden alfabético

Proteína de 130 kDa rica en leucinas, LPPRC_HUMAN P42704

[0143] Función desconocida. Expresada de manera ubicua. Su expresión es más elevada en corazón, músculo esquelético, riñón e hígado, expresión intermedia en cerebro, colon no mucoso, bazo y placenta, y más baja en intestino delgado, timo, pulmón y leucocitos de sangre periférica.

Adiponectina ADIPO_HUMAN Q15848

[0144] Es un importante regulador negativo en la hematopoyesis y en sistemas inmunitarios; puede estar involucrada en la terminación de respuestas inflamatorias a través de sus funciones inhibitorias. Inhibe la señalización del factor de necrosis endotelial- κ -B a través de la vía dependiente del AMPc. Inhibe la expresión de moléculas de adhesión endotelial inducida por el TNF- α . Está involucrada en el control del metabolismo de las grasas y de la sensibilidad a insulina. Sintetizada exclusivamente por adipocitos y secretada en el plasma.

Precursor de la proteína AMBP (microglobulina α 1a), AMBP_HUMAN P02760

[0145] El AMBP_HUMAN contiene 2 cadenas, microglobulina α 1a y la cadena ligera del inhibidor de inter- α -tripsina. La microglobulina α 1a se encuentra en muchos fluidos fisiológicos incluyendo el plasma, la orina y el fluido cerebroespinal. Aparece no sólo en forma de monómero libre sino también en complejos con IgA y albúmina. Es una proteína inmunomoduladora con un amplio espectro de posibles aplicaciones clínicas y parece un marcador prometedor para la evaluación de la función tubular. El AMBP podría ser un complemento valioso a los niveles séricos de creatinina en la evaluación de la función renal en receptores de trasplante de riñón. Es expresado por el hígado y se segrega en plasma.

Precursor de la apolipoproteína A-IV, APOA4_HUMAN P06727

[0146] Puede tener un papel en quilomicrones y la secreción de VLDL y el catabolismo. Necesario para la activación eficiente de la lipoproteína lipasa por parte del ApoC-II; potente activador de LCAT. El ApoA-IV es un componente principal del HDL y de los quilomicrones. Se sintetiza principalmente en el intestino y se segrega en plasma.

Precursor de la ceruloplasmina, CERU_HUMAN P00450

[0147] La ceruloplasmina es una glicoproteína azul de unión a cobre (6-7 átomos por molécula). Tiene actividad ferroxidasa que oxida el hierro (II) a hierro (III) sin liberar especies radicalarias de oxígeno. Está involucrada en el transporte de hierro a través de la membrana celular.

Precursor de la proteína 2 relacionada con el factor H del complemento, FHR2_HUMAN P36980

[0148] Podría estar involucrado en la regulación del complemento. Se puede asociar a lipoproteínas y puede desempeñar un papel en el metabolismo de los lípidos. Es expresado por el hígado y se segrega en plasma.

Subunidad 10 del factor 3 de iniciación de la traducción en eucariotas, IF3A_HUMAN Q14152

[0149] Se une a la subunidad 40S de ribosoma y promueve la unión de metionil-tARNi y ARNm.

Precursor de la glicoproteína α 1B, A1BG_HUMAN P04217

[0150] Función desconocida.

Precursor I de la glicoproteína β 2 (Apolipoproteína H) APOH_HUMAN P02749

[0151] Se une a diversos tipos de sustancias cargadas negativamente como la heparina, fosfolípidos, y dextrano sulfato. Puede prevenir la activación de la cascada de coagulación intrínseca de la sangre uniéndose a fosfolípidos de la superficie de células dañadas. Es expresado por el hígado y se segrega en plasma.

Precursor de la hemopexina (glicoproteína β 1B) HEMO_HUMAN P02790

[0152] Se une a grupos hemo y lo transporta al hígado para su descomposición y recuperación del hierro, tras lo cual la hemopexina libre regresa a la circulación. Es expresado por el hígado y se segrega en plasma.

Precursor del cofactor II de la heparina, HEP2_HUMAN P05546

[0153] Inhibidor de la trombina activado por glicosaminoglicanos, heparina o dermatan sulfato. En presencia de este último, el HC-II se convierte en el inhibidor predominante de la trombina en lugar de la antitrombina III (AT-

III). También inhibe a la quimotripsina, pero de una manera dependiente de glicosaminoglicanos. Es expresado predominantemente en el hígado.

Precursor H1 de la cadena pesada del inhibidor de la inter- α -tripsina, ITIH1_HUMAN P19827

5

[0154] Puede actuar como vehículo del hialuronano en suero o como proteína de unión entre el hialuronano y otra proteína de la matriz, incluyendo aquellas de la superficie celular en tejidos para regular la localización, síntesis y degradación de hialuronano que son esenciales para las células que experimentan procesos biológicos. Contiene un péptido potencial que podría estimular un amplio espectro de células fagocíticas.

10

Precursor del cininógeno-1, KNG1_HUMAN P01042

[0155]

15

(1) Los cininógenos son inhibidores de tior proteasas; (2) el cininógeno HMW desempeña un papel importante en la coagulación de la sangre ayudando a situar de manera óptima la precalicreína y el factor XI junto al factor XII; (3) el cininógeno HMW inhibe la agregación de los trombocitos inducida por trombina y plasmina; (4) el péptido activo bradiquinina que es liberado del cininógeno HMW presenta una variedad de efectos fisiológicos: (4A) influencia en la contracción del músculo liso, (4B) inducción de hipotensión, (4C) natriuresis y diuresis, (4D) reducción en el nivel sanguíneo de glucosa, (4E) es un mediador de la inflamación y provoca (4E1) un incremento de la permeabilidad vascular, (4E2) estimulación de los nociceptores (4E3) liberación de otros mediadores de la inflamación (por ejemplo, prostaglandinas), (4F) tiene un efecto cardioprotector (directamente a través de la acción de la bradiquinina, indirectamente a través de la acción del factor de relajación derivado del endotelio); (5) el cininógeno LMW inhibe la agregación de trombocitos; (6) el cininógeno LMW, a diferencia del cininógeno HMW, no está involucrado en la coagulación de la sangre.

20

25

Precursor de la glicoproteína α 2 rica en leucinas, A2GL_HUMAN P02750

[0156] Es una proteína segregada en plasma.

30

Precursor de la macroglobulina α 2, A2MG_HUMAN P01023

[0157] Es capaz de inhibir las cuatro clases de proteinasas mediante un mecanismo de "atrapamiento" único. Esta proteína presenta una extensión peptídica, denominada "región cebo" que contiene sitios de escisión específicos para diferentes proteinasas. Cuando una proteinasa escinde la región cebo, se induce un cambio conformacional en la proteína que atrapa a la proteinasa. La enzima atrapada permanece activa contra substratos de bajo peso molecular (la actividad contra substratos de elevado peso molecular se ve enormemente reducida). Después de la escisión en la región cebo se hidroliza un enlace tioéster y media la unión covalente de la proteína a la proteinasa.

35

40

Precursor del factor pigmentario derivado del epitelio, PEDF_HUMAN P36955

[0158] Proteína neurotrófica; induce una diferenciación neuronal extensiva en células de retinoblastoma. Potente inhibidor de la angiogénesis. Puesto que no experimenta la transición conformacional de S (estresada) a R (relajada) característica de serpinas activas, no presenta actividad inhibitoria de serin-proteasas. Es una proteína secretada y se encuentra en las células epiteliales del pigmento de la retina y en el plasma sanguíneo.

45

Precursor de la proteína plasmática de unión al retinol, RETBP_HUMAN P02753

50

[0159] Suministra retinol desde los depósitos hepáticos a los tejidos periféricos. En plasma, el complejo RBP-retinol interacciona con la transtiretina, y esto evita su pérdida por filtración a través de los glomérulos del riñón. Es una proteína segregada.

Precursor del plasminógeno, PLMN_HUMAN P00747

55

[0160] La plasmina, formada por conversión a partir del plasminógeno, disuelve la fibrina de los coágulos sanguíneos y actúa como factor proteolítico en una variedad de diferentes procesos incluyendo el desarrollo embrionario, la remodelación tisular, la invasión tumoral, y la inflamación; durante la ovulación debilita las paredes de los folículos de Graaf. Activa el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa, colagenasas y varios cimógenos

del complemento, tales como C1 y C5. Escinde la fibrina, fibronectina, trombospondina, laminina y factor de von Willebrand. Su papel en la remodelación tisular y en la invasión tumoral se puede modular con la CSPG4. Es una proteína segregada y está presente en el plasma y en muchos otros fluidos extracelulares. Se sintetiza en el riñón.

5 Precursor de la transtiretina, TTHY_HUMAN (prealbúmina syn) P02766

- [0161]** Proteína de unión a la hormona tiroidea. Probablemente transporta tiroxina desde el torrente sanguíneo al cerebro. Es una proteína segregada. Más abundante en el plexo coroide y también presente en el hígado. Aproximadamente el 40% de la transtiretina plasmática circula en un complejo proteína-proteína fuertemente unido a la proteína plasmática de unión al retinol (RBP). La formación del complejo con la RBP estabiliza la unión del retinol a la RBP y reduce la filtración glomerular y el catabolismo renal de la molécula RBP relativamente pequeña.

Conclusión

- [0162]** En este estudio se identificó un grupo de proteínas como biomarcadores candidatos. Los resultados del grupo de estudio y del grupo de validación mostraron una excelente correlación en la regulación proteica que demuestra la alta calidad del grupo de muestras de suero y del procedimiento proteómico.

Evolución temporal de las regulaciones de las proteínas

- [0163]** Los histogramas de las evoluciones temporales de las regulaciones de las proteínas procedentes de muestras de enfermedad y control de los puntos de tiempo 1, 2 y 3 muestran tres regulaciones llamativas, a saber, la región C de la cadena I μ (puntos n $^{\circ}$ 210, 213 y 214), el precursor del factor pigmentario derivado del epitelio (punto n $^{\circ}$ 570) y el precursor de la proteína AMBP (microglobulina α 1a) (puntos n $^{\circ}$ 722, 728, 730 y 735). El nivel de I μ se incrementa regularmente en receptores sanos mientras que se incrementa desde el punto de tiempo 1 a 2 y se reduce de nuevo desde el punto de tiempo 2 a 3 en receptores que rechazan el trasplante. Los niveles del precursor del factor pigmentario derivado del epitelio y de microglobulina α 1 se reducen regularmente en receptores sanos mientras que se reducen desde el punto de tiempo 1 a 2 y se incrementan de nuevo desde el punto de tiempo 2 a 3 en receptores que rechazan el trasplante. Se observa el mismo perfil de expresión con los puntos n $^{\circ}$ 445, 461, 562, 657, 734, 785, 825, 826, 854 y 862 (véase Tabla 4 y 5).

Biomarcadores candidatos

- [0164]** A partir de las comparaciones individuales y de las regulaciones de la evolución temporal, se pudieron identificar 16 biomarcadores candidatos (se proporcionan los números de acceso de las bases de datos de proteínas/ácidos nucleicos Swiss-Prot/EMBL):

- Precursor de la N-acetilmuramoi-L-alanina amidasa Q96PD5/AF384856
- 40** Adiponectina Q15848/D45371
Precursor de la proteína AMBP (microglobulina α 1a) P02760/X04225
Precursor de la cadena α de la proteína de unión a C4b P04003/M31452; BC022312
Precursor de la ceruloplasmina P00450/M13699; M13536
- 45** Precursor C3 del complemento P01024/K02765
Precursor C9 del componente del complemento P02748/BC020721; K02766
Precursor del factor D del complemento P00746/M84526
Glicoproteína α 1B P04217/AF414429; BC035719
- 50** Precursor I de la glicoproteína β 2 P02749/X58100; X53595; X57847; M62839; S80305; BC020703; BC026283
Precursor del cofactor II de la heparina P05546/M12849; X03498
Proteína de la región C de la cadena I μ P01871/X17115
Precursor de la glicoproteína α 2 rica en leucinas P02750/AF403428;
- 55** BC034389; BC070198
Precursor del factor pigmentario derivado del epitelio P36955/M76979; AF400442
Precursor de la proteína plasmática de unión al retinol P02753/X00129; BC020633

Subunidad 10 del factor 3 de iniciación de la traducción
Q14152/U58046; U78311

Conclusión

5

[0165] 240 muestras de suero de receptores de trasplante de riñón se sometieron a un procedimiento proteómico 2DE con el fin de identificar nuevos biomarcadores candidatos para la detección temprana del rechazo de riñón. La clara correlación de los resultados del grupo de estudio y del grupo de validación demuestra la robustez y reproducibilidad de nuestro procedimiento proteómico, especialmente la preparación de muestras de suero
10 limpiando por inmunoafinidad cromatográfica seis proteínas muy abundantes que está disponible sólo desde 2003, así como la alta calidad del grupo de muestras de suero. Se encontró que 29 proteínas están reguladas entre las tres condiciones seleccionadas de receptores de trasplante de riñón, 20 de las cuales están relacionadas con la respuesta inflamatoria e inmunitaria durante el rechazo del riñón o la enfermedad renal. Como resultado, se pudieron identificar 16 proteínas como nuevos biomarcadores candidatos.

15

Análisis estadístico de los datos del gel 2D con SIMCA-P

Preprocesamiento de los datos

20 **[0166]** Los datos de los puntos normalizados y con el ruido corregido se exportaron de ProGenesis a Excel y se dispusieron automáticamente en un formato adecuado mediante un programa desarrollado por nosotros para un análisis posterior. Para cada comparación de los datos control y los datos tratados, se generaron automáticamente el número de puntos en cada grupo, el valor medio, el coeficiente de variación y la prueba t de Student de dos colas y la prueba de Mann-Whitney computerizada mediante Statistix (Versión 1.5). En paralelo, los datos se importaron
25 en el *software* SIMCA-P (Versión 11; Umetrics) y los datos de los puntos se valoraron para determinar si alguno de los puntos requería un preprocesamiento previo a cualquier análisis posterior. Para los datos de los puntos (variables), se evaluaron dos procedimientos de parametrización diferentes; la varianza unitaria (VU) y Pareto (Par). La VU es el procedimiento de parametrización por defecto y la parametrización de Pareto se encuentra entre la no parametrización y la parametrización de la VU y proporciona a la variable una varianza igual a su desviación
30 estándar en lugar de una varianza unitaria. Se evaluaron los tres procedimientos de transformación diferentes: sin transformación, con transformación automática y con transformación Log10. Por defecto, no se produce transformación, la transformación automática se lleva a cabo mediante el *software* que comprueba si las variables necesitan una transformación logarítmica y, si es el caso, la aplica. La transformación Log10 se aplica a puntos que
35 presentan un sesgo positivo (>0,7) para dar distribuciones más próximas a la normal. Se obtuvieron los parámetros de bondad del ajuste óptima (R^2) y de bondad de predicción acumulativa (Q^2 [cum]) con la combinación del procedimiento de parametrización de la VU con una transformación automática para el control (geles C) y geles de la enfermedad (geles D) como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Procedimientos de parametrización y transformación probados para las variables

Modelo	Nº de componentes	Transformación	Parametrización	R ² X	R ² Y	Q ² (cum)
ACP con geles C	4	Sin transformación	VU	0,354	X	0,0682
ACP con geles C	3	Sin transformación	Pareto	0,322	X	0,0456
ACP con geles C	4	Automática	VU	0,398	X	0,0846
ACP con geles C	3	Log10	VU	0,336	X	0,0923
ACP con 2 geles C	5	Automática	VU	0,439	X	0,0838
ACP con geles D	3	Sin transformación	VU	0,303	X	0,08
ACP con geles D	3	Sin transformación	Pareto	0,339	X	0,0705
ACP con geles D	4	Automática	VU	0,41	X	0,127
ACP con geles D	4	Automática	Pareto	0,41	X	0,0951
ACP con geles D	4	Log10	Pareto	0,402	X	0,0852

40

[0167] Se realizaron dos tipos de análisis. Inicialmente, se aplicó un procedimiento no supervisado denominado análisis de los componentes principales (ACP) a todos los grupos experimentales. En segundo lugar, se aplicó un procedimiento supervisado denominado el análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales (AD-MCP) a cuatro grupos de datos que comparan el Control-1 versus Control-3; Enfermedad-1 versus Enfermedad-3;
45 Control-1 versus Enfermedad-1 y Control-3 versus Enfermedad-3 para averiguar si se puede encontrar alguna diferencia para distinguir entre los grupos de muestra.

Análisis ACP del grupo de datos control

[0168] El análisis de los componentes principales (ACP) es un procedimiento de proyección multivariable diseñado para extraer y presentar la variación sistemática en la matriz de datos (en nuestro caso, geles y volúmenes de los puntos). Con el análisis ACP, están disponibles una serie de herramientas diagnósticas y de interpretación.

[0169] Se auto-ajustó un modelo de cuatro componentes al grupo de datos control. Los parámetros del modelo eran los siguientes: bondad del ajuste (R^2) = 0,398 y bondad de predicción acumulativa (Q^2 [cum]) = 0,0846. La Figura 8 presenta las puntuaciones de las observaciones del modelo.

[0170] En la Figura 8 podemos observar que dos geles están situados fuera de la elipse y se podrían considerar como aislados fuertes (C45_1 y C46_3). Eliminamos estos dos geles y se ajustó un nuevo modelo con cinco componentes (véase Tabla 7). Los parámetros del modelo eran los siguientes: R^2 = 0,439 y Q^2 [cum] = 0,0838. La Figura 9 muestra las puntuaciones de las observaciones del modelo.

[0171] A pesar de que el parámetro de la bondad del ajuste (R^2) indica que se puede explicar el 44% de la varianza total en los datos, el valor bajo de Q^2 sugiere que el modelo no es muy robusto. Como se muestra en la Figura 9, es claro que el modelo no presenta núcleos entre los geles del grupo. Un modelo de nucleación típico puede presentar dos grupos, uno correspondiente a los geles control_1 y el segundo a los geles control_3.

Análisis ACP del grupo de datos de la enfermedad

[0172] Se auto-ajustó un modelo de cuatro componentes al grupo de datos control. Los parámetros del modelo eran los siguientes: bondad del ajuste (R^2) = 0,41 y bondad de predicción acumulativa (Q^2 [cum]) = 0,127. La Figura 10 presenta las observaciones del modelo.

[0173] A pesar de que el parámetro de la bondad del ajuste (R^2) indica que se puede explicar el 41% de la varianza total en los datos, el valor bajo de Q^2 sugiere que el modelo no es muy robusto. Como se muestra en la Figura 10, no observamos aislados, ni el modelo presenta núcleos entre los geles del grupo.

[0174] Para los dos modelos, observamos valores bajos para R^2 y valores próximos a cero para Q^2 , lo que nos lleva a concluir que estos modelos no están bien explicados o predichos. Incluso si ya se observan valores bajos para los datos del gel 2D, especialmente en relación con el análisis de la muestra humana, las posibles explicaciones son las propias muestras (elevada heterogeneidad biológica) y/o los tratamientos de las muestras (ciclos de congelación-descongelación, agotamiento, electroforesis en gel 2D).

AD-MCP del grupo de datos control

[0175] El análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales (AD-MCP) es un procedimiento para relacionar dos matrices de datos, X (geles) e Y (volumen del punto), entre sí mediante un modelo multivariado lineal. Este tipo de análisis es adecuado para determinar si se podría encontrar alguna diferencia para discriminar entre el grupo control_1 (sangre extraída durante el trasplante) y el grupo control_3 (sangre extraída cuando el trasplante haya sido validado).

[0176] Se auto-ajustó un modelo de dos componentes al grupo de datos de los geles control. Los parámetros eran los siguientes: R^2X = 0,185; R^2Y = 0,898 y Q^2 = 0,431. El parámetro adicional R^2Y describe la bondad del ajuste a los datos de Y que contienen la clase de observaciones. Las observaciones de las puntuaciones en los dos componentes MCP del modelo se presentan en la Figura 11. El valor de Q^2 próximo a 0,5 se podría considerar como bueno. Como se observa en la Figura 11, la separación de los grupos parece excelente.

[0177] Las gráficas de carga de este modelo MCP se presentan en la Figura 12. Con un tipo más claro se indica el número de puntos seleccionados con la aproximación univariada. Las gráficas en los extremos del eje horizontal describen las diferencias entre los grupos. En la Figura 12 podemos observar que los números en un tipo más claro están localizados en los extremos del eje, lo que refuerza el hecho de que estos puntos pueden reflejar una discriminación significativa entre los dos grupos comparados. Esta observación muestra una buena correlación entre la aproximación univariada como multivariada.

AD-MCP del grupo de datos de la enfermedad

[0178] Aplicamos este tipo de análisis para determinar si se puede encontrar alguna diferencia para discriminar entre el grupo de enfermedad_1 (sangre extraída durante el trasplante) y el grupo de enfermedad_3 (sangre extraída cuando el trasplante haya sido rechazado).

[0179] Se auto-ajustó un modelo de dos componentes al grupo de datos de los geles control. Los parámetros eran los siguientes: $R^2X = 0,143$; $R^2Y = 0,902$ y $Q^2 = 0,301$. Las observaciones de las puntuaciones en los dos componentes MCP del modelo se presentan en la Figura 13. Como se observa en la Figura 13, la separación de los grupos parece excelente.

[0180] Las gráficas de carga de este modelo MCP se presentan en la Figura 14. Con un tipo más claro se indica el número de puntos seleccionados con la aproximación del gel 2D. En la Figura 14 podemos observar que los números en un tipo más claro están localizados en los extremos del eje, lo que refuerza el hecho de que estos puntos pueden reflejar una discriminación significativa entre los dos grupos comparados. Esta observación muestra un buen solapamiento tanto entre la aproximación univariada como multivariada.

Análisis del grupo de datos que contiene los grupos Control 1 y de Enfermedad 1 ("muestra 1")Análisis ACP del grupo de datos de la muestra 1

[0181] Se auto-ajustó un modelo de seis componentes al grupo de datos control. Los parámetros del modelo eran los siguientes: bondad del ajuste (R^2) = 0,481 y bondad de predicción acumulativa (Q^2 [cum]) = 0,0519. La Figura 15 presenta las gráficas de las observaciones del modelo.

[0182] A pesar de que el parámetro de la bondad del ajuste (R^2) indica que se puede explicar el 48% de la varianza total en los datos, el valor bajo de Q^2 sugiere que el modelo no es muy robusto. Como se muestra en la Figura 15, no observamos aislados fuertes, ni el modelo presenta núcleos entre los geles del grupo.

Análisis AD-MCP del grupo de datos de la muestra 1

[0183] Se auto-ajustó un modelo de dos componentes al grupo de datos. Los parámetros eran los siguientes: $R^2X = 0,199$; $R^2Y = 0,828$ y $Q^2 = 0,148$. Las observaciones de las puntuaciones en los dos componentes MCP del modelo se presentan en la Figura 16. Como se observa en la Figura 16, la separación de los grupos parece excelente.

[0184] Las gráficas de carga de este modelo MCP se presentan en la Figura 17. Con un tipo más claro se indica el número de puntos seleccionados con la aproximación del gel 2D. En la Figura 17 podemos observar que los números en un tipo más claro están localizados en los extremos del eje, lo que refuerza el hecho de que estos puntos pueden reflejar una discriminación significativa entre los dos grupos comparados. Esta observación muestra un buen solapamiento tanto entre la aproximación estadística como la electroforesis en gel 2D.

Análisis del grupo de datos que contiene los grupos Control 3 y de Enfermedad 3 ("muestra 3")Análisis ACP del grupo de datos de la muestra 3

[0185] Durante un análisis preliminar con todos los geles procedentes del grupo de muestra_3, observamos un aislado fuerte (gel D12_3, datos no mostrados). En consecuencia, eliminamos el gel del análisis y realizamos uno nuevo. Se auto-ajustó un modelo de seis componentes al grupo de datos de la muestra_3. Los parámetros del modelo eran $R^2 = 0,488$ y $Q^2 = 0,0757$. Las puntuaciones de las observaciones para los dos componentes MCP de este modelo se presentan en la Figura 18.

[0186] Los bajos valores para R^2 y Q^2 sugieren que el modelo no es particularmente robusto. Examinando las posiciones de los geles en los dos primeros componentes es claro que no hay ningún patrón de nucleación entre las observaciones de este grupo de datos.

Análisis AD-MCP del grupo de datos de la muestra 3

[0187] Se auto-ajustó un modelo de cuatro componentes al grupo de datos. Los parámetros eran los siguientes: $R^2X = 0,302$; $R^2Y = 0,992$ y $Q^2 = 0,725$. En general, una $Q^2 > 0,7$ se considera muy buena. Las

observaciones de las puntuaciones en los dos componentes MCP del modelo se presentan en la Figura 19. Como se observa en la Figura 19, la separación de los grupos parece excelente.

[0188] Las gráficas de carga de este modelo MCP se presentan en la Figura 20. Con un tipo más claro se indica el número de puntos seleccionados con la aproximación del gel 2D. En la Figura 20 podemos observar que los números en un tipo más claro están localizados en los extremos del eje, lo que refuerza el hecho de que estos puntos pueden reflejar una discriminación significativa entre los dos grupos comparados. Esta observación muestra un buen solapamiento tanto entre la aproximación estadística como la electroforesis en gel 2D.

REIVINDICACIONES

1. Uso de la presencia o de una cantidad del precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, o anticuerpos contra dicha proteína, como marcador para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal.
5
2. Uso de la presencia o de una cantidad de un ácido nucleico que codifica el precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa como marcador para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal.
3. Un procedimiento para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal, el procedimiento que comprende la
10 determinación de la presencia o la cantidad del precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, o anticuerpos contra él, en una muestra procedente de un paciente.
4. Un procedimiento para el diagnóstico y/o pronóstico de daño renal, el procedimiento que comprende la
15 determinación de la presencia o la cantidad de un ácido nucleico que codifica el precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, en una muestra procedente de un paciente.
5. El procedimiento de la reivindicación 3 o de la reivindicación 4, donde la muestra es una muestra de tejido renal, una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma o una muestra de orina.
- 20 6. El uso de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde el daño renal está provocado por un rechazo crónico del trasplante después del trasplante de riñón.
7. El uso o el procedimiento de la reivindicación 6, donde el daño renal está provocado por nefropatía crónica del
25 aloinjerto.
8. El uso de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde el daño renal está provocado por enfermedad o toxicidad.
9. El uso o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende adicionalmente la
30 detección de una cualquiera de la adiponectina, el precursor de la proteína AMBP (microglobulina α 1), el precursor de la cadena α de la proteína de unión a C4b, el precursor de la ceruloplasmina, el precursor C3 del complemento, el precursor C9 del componente del complemento, el precursor del factor D del complemento, la glicoproteína α 1B, el precursor I de la glicoproteína β 2, el precursor del cofactor II de la heparina, la proteína de la región C de la cadena I μ , el precursor de la glicoproteína α 2 rica en leucinas, el precursor del factor pigmentario derivado del epitelio, el
35 precursor de la proteína plasmática de unión al retinol y la subunidad 10 del factor 3 de iniciación de la traducción.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, donde el procedimiento comprende las etapas de:
- 40 (a) puesta en contacto de una muestra procedente de un paciente con un soporte sólido que presenta inmovilizado sobre él un agente de unión que tiene sitios de unión que son capaces de unirse específicamente a la proteína, anticuerpo o ácido nucleico con una muestra procedente de un paciente en condiciones en las que la proteína, anticuerpo o ácido nucleico se unen al agente de unión; y,
- 45 (b) la determinación de la presencia o la cantidad de la proteína, anticuerpo o ácido nucleico unido al agente de unión.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, donde la etapa (b) comprende (i) la puesta en contacto del soporte sólido con un agente de revelado que es capaz de unirse a los sitios de unión ocupados, sitios de unión no
50 ocupados o la proteína, anticuerpo o ácido nucleico, el agente de revelado que comprende un marcador químico y (ii) la detección del marcador químico para obtener un valor representativo de la presencia o la cantidad de la proteína, anticuerpo o ácido nucleico en la muestra.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, donde el procedimiento comprende la
55 detección de dicha proteína o proteínas marcadoras por espectroscopía de masas.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, donde la proteína está inmovilizada sobre un soporte sólido.
14. Un kit para el uso en el diagnóstico o pronóstico de daño renal mediante la determinación de la presencia o la

cantidad del precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, o anticuerpos contra él, o un ácido nucleico que codifica el precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, en una muestra procedente de un paciente, el kit que comprende:

- 5 (a) un soporte sólido que presenta un agente de unión capaz de unirse al analito inmovilizado sobre él;
- (b) un agente de revelado que comprende un marcador químico; y,
- (c) uno o más componentes seleccionados del grupo constituido por disoluciones de lavado, diluyentes y tampones.
- 10 15. Un kit según la reivindicación 14 que sirve para el diagnóstico del rechazo crónico de trasplante después de trasplante de riñón.
- 15 16. Un kit según la reivindicación 15 que sirve para el diagnóstico de nefropatía crónica del aloinjerto.
17. Un kit según la reivindicación 14 que sirve para el diagnóstico de daño renal provocado por enfermedad o toxicidad.
- 20 18. El procedimiento de la reivindicación 11, o el kit de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, donde el marcador químico es un marcador químico radiactivo, un fluoróforo, un fósforo, un colorante láser, un colorante cromógeno, una partícula coloidal macromolecular, una perla de látex que está coloreada, es magnética o paramagnética, una enzima que cataliza una reacción que produce un resultado detectable o el marcador químico es un indicador.
- 25 19. El procedimiento de la reivindicación 10, de la reivindicación 11 o de la reivindicación 18, o el kit de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, donde el agente de unión inmovilizado sobre el soporte sólido es el precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, o un fragmento del mismo.
- 30 20. El procedimiento de la reivindicación 10, de la reivindicación 11 o de la reivindicación 18, o el kit de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, donde el agente de unión inmovilizado sobre el soporte sólido es un anticuerpo capaz de unirse al precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, o a un fragmento del mismo.
- 35 21. El procedimiento de la reivindicación 10, de la reivindicación 11 o de la reivindicación 18, o el kit de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, donde el agente de unión inmovilizado sobre el soporte sólido es un ácido nucleico que codifica el precursor de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, o un fragmento del mismo.
- 40 22. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10, 11 ó 18, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia o la cantidad de una pluralidad de proteínas marcadoras o anticuerpos asociados al rechazo crónico en una única muestra.
23. El procedimiento de la reivindicación 22, donde el procedimiento emplea una pluralidad de agentes de unión que están inmovilizados en localizaciones predefinidas sobre el soporte sólido.

FIG. 1

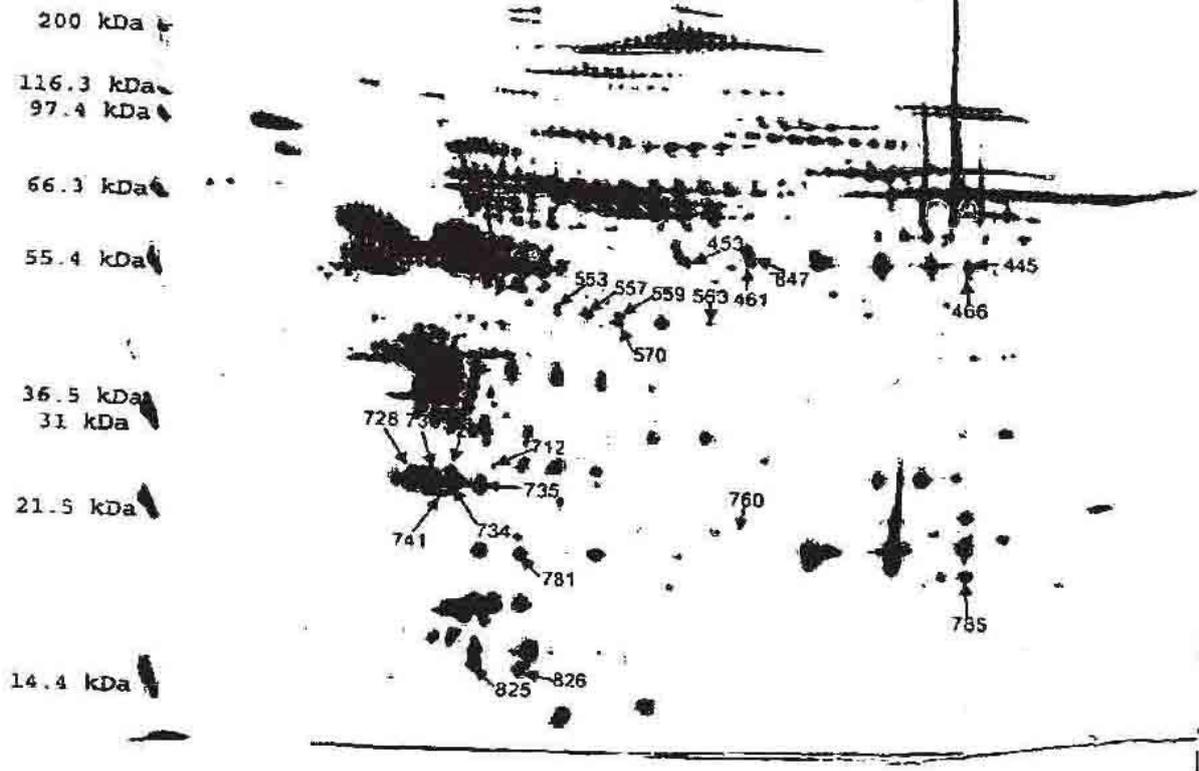


FIG. 2

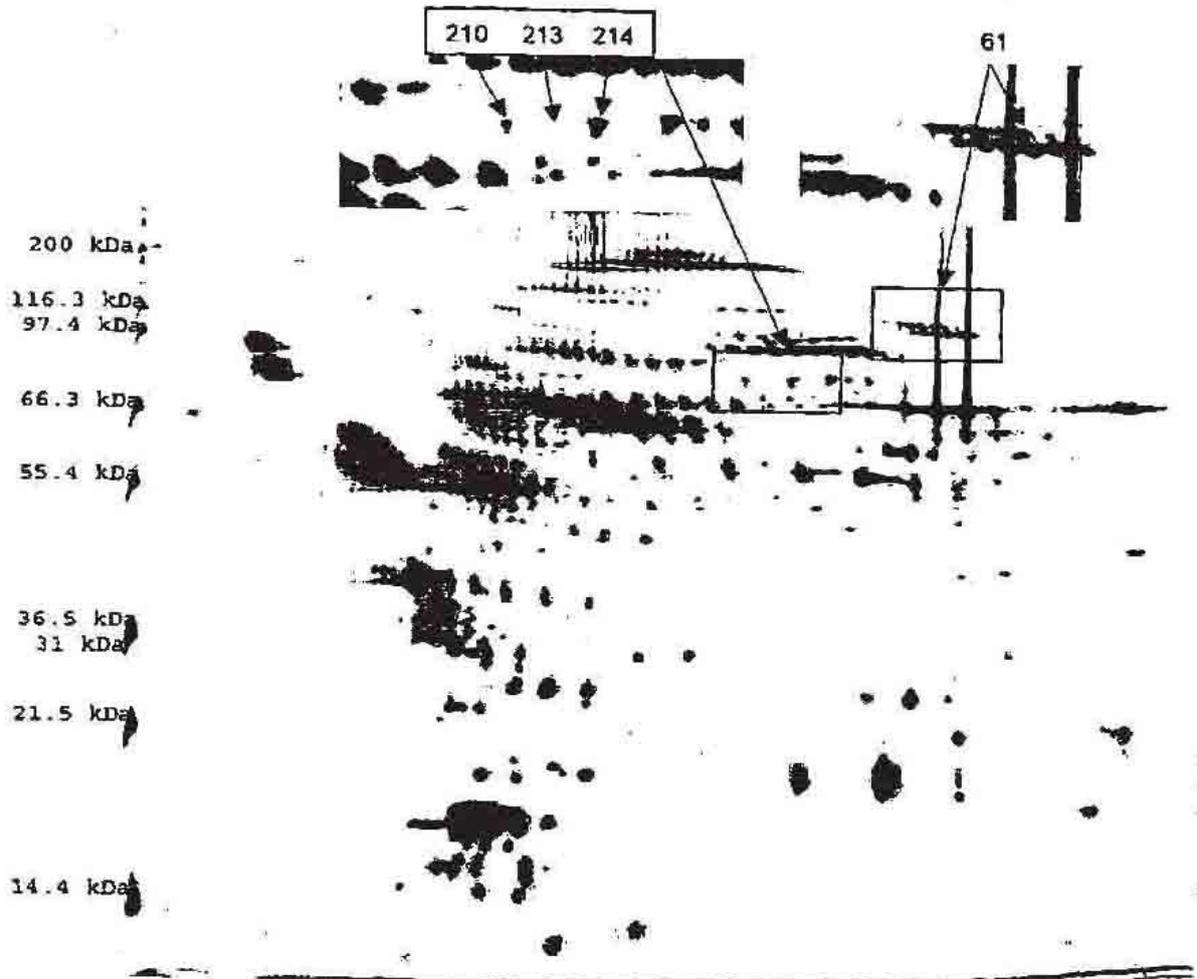


FIG. 3

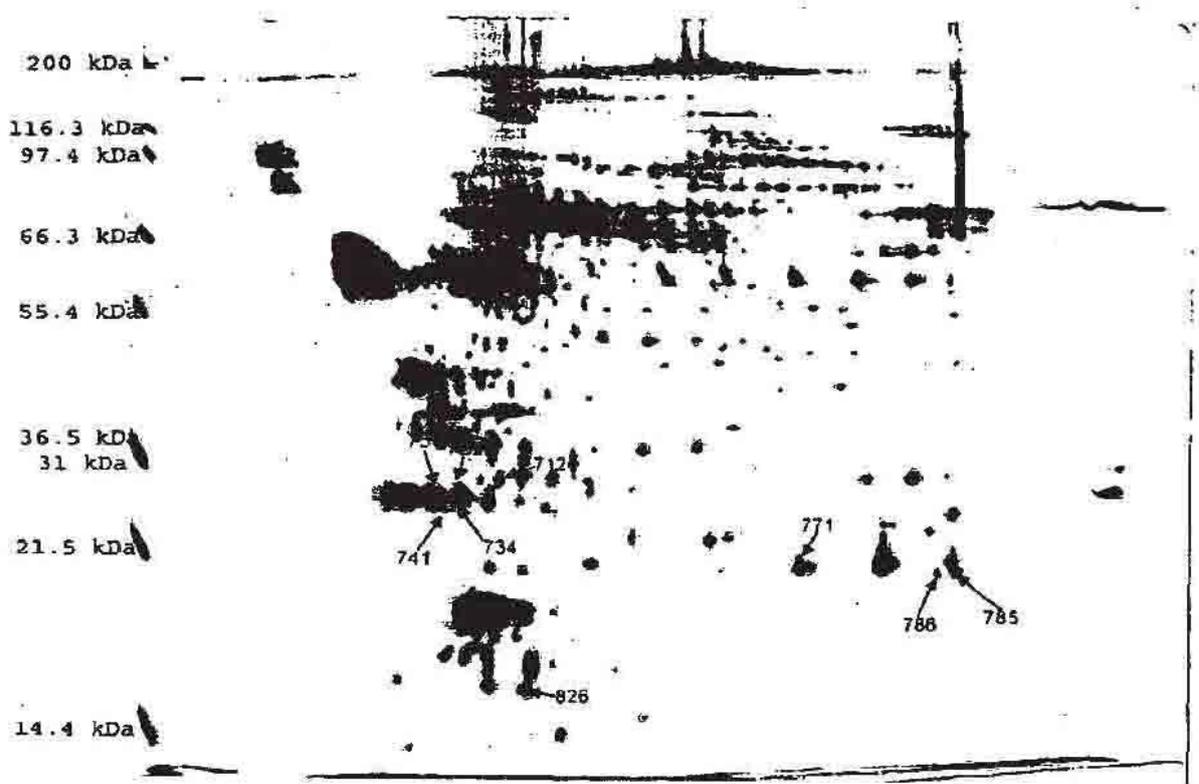
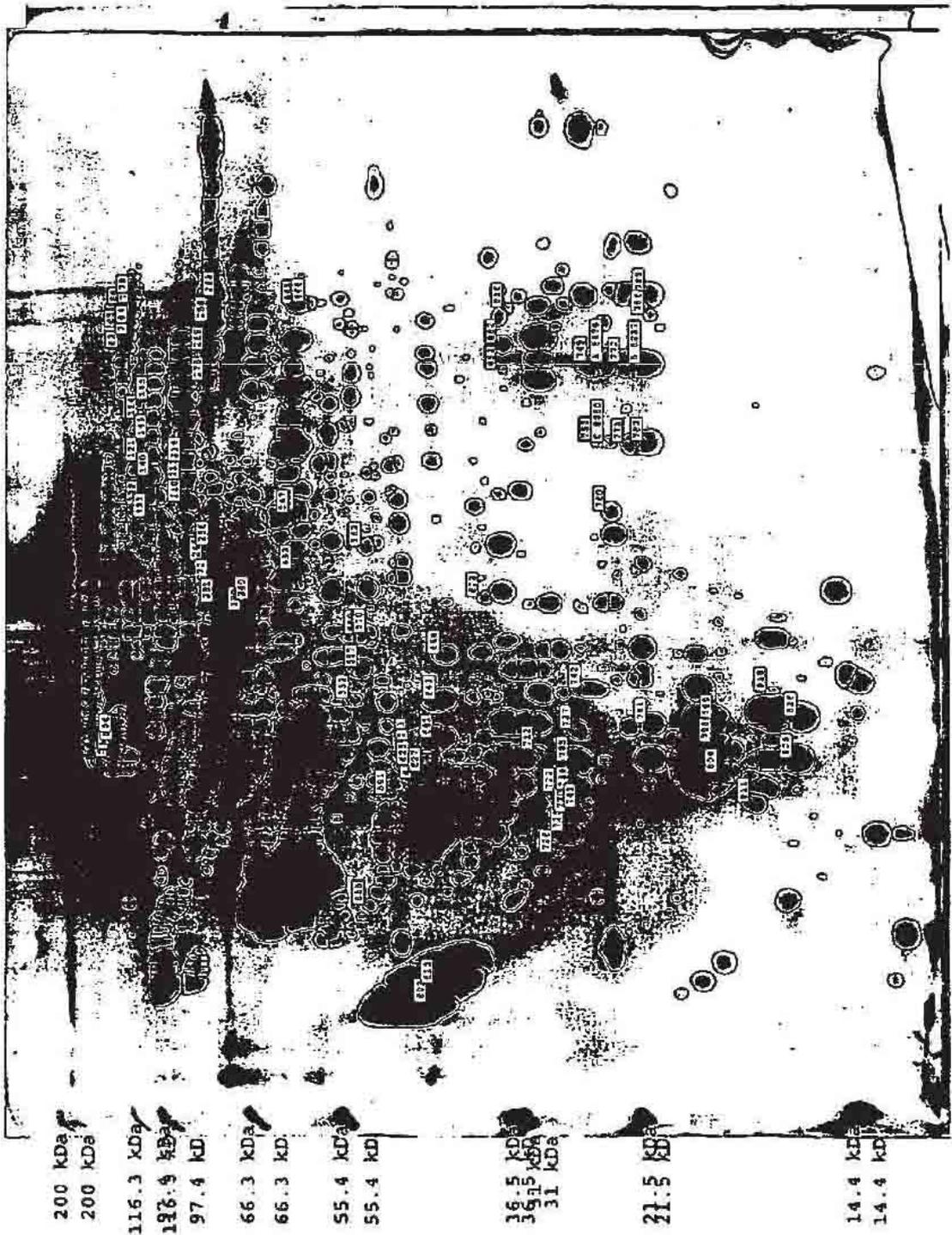


FIG. 4



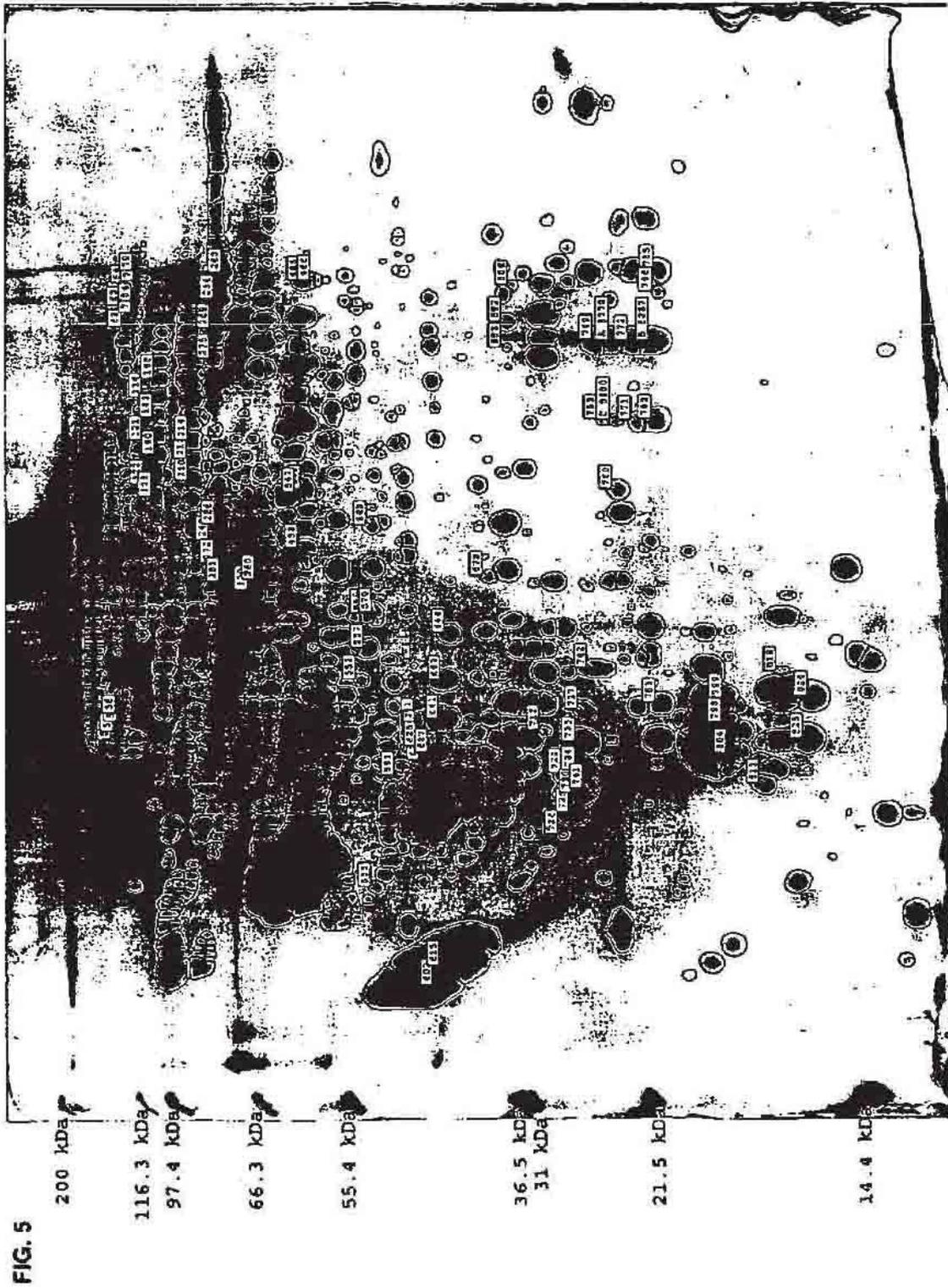
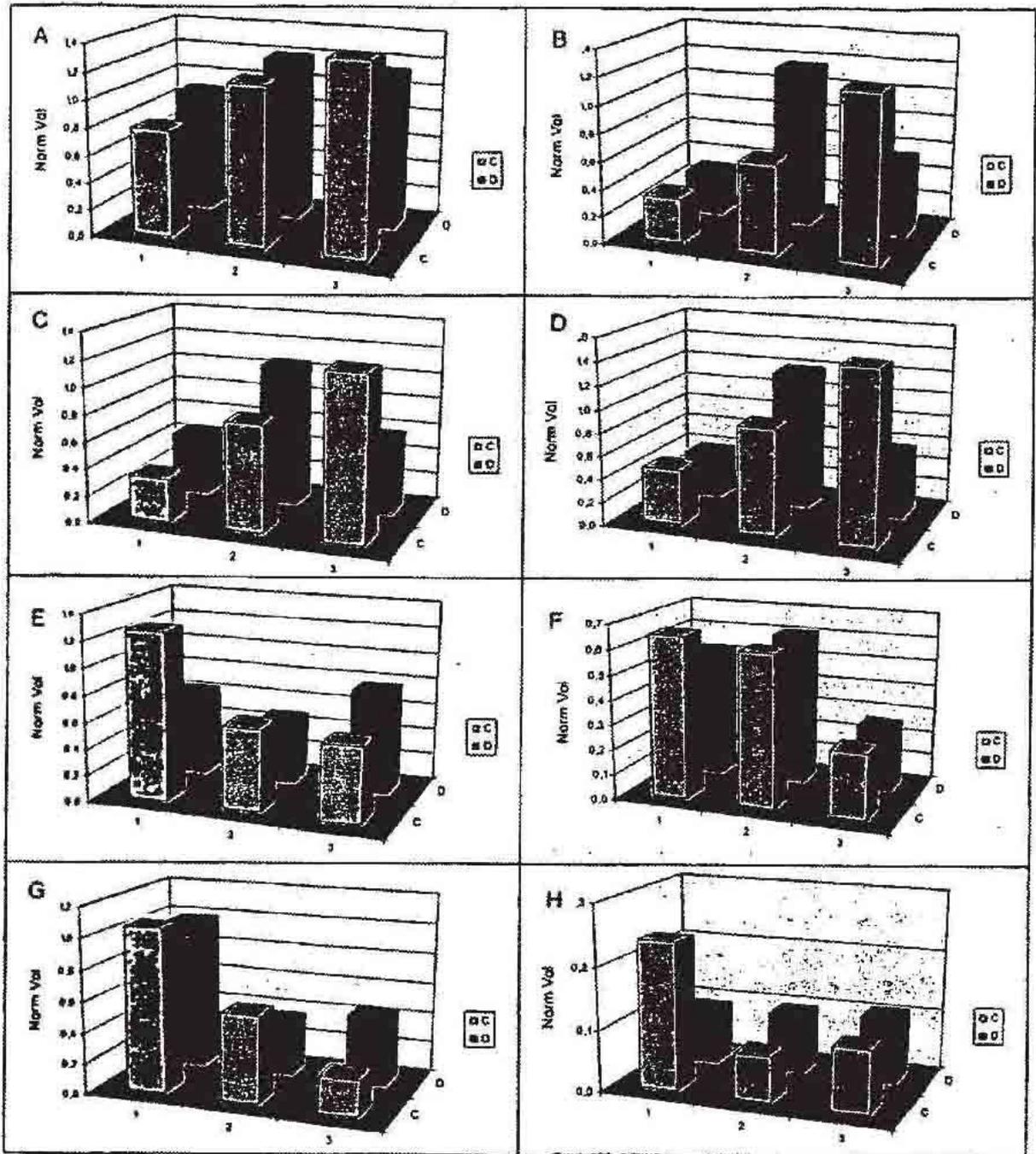
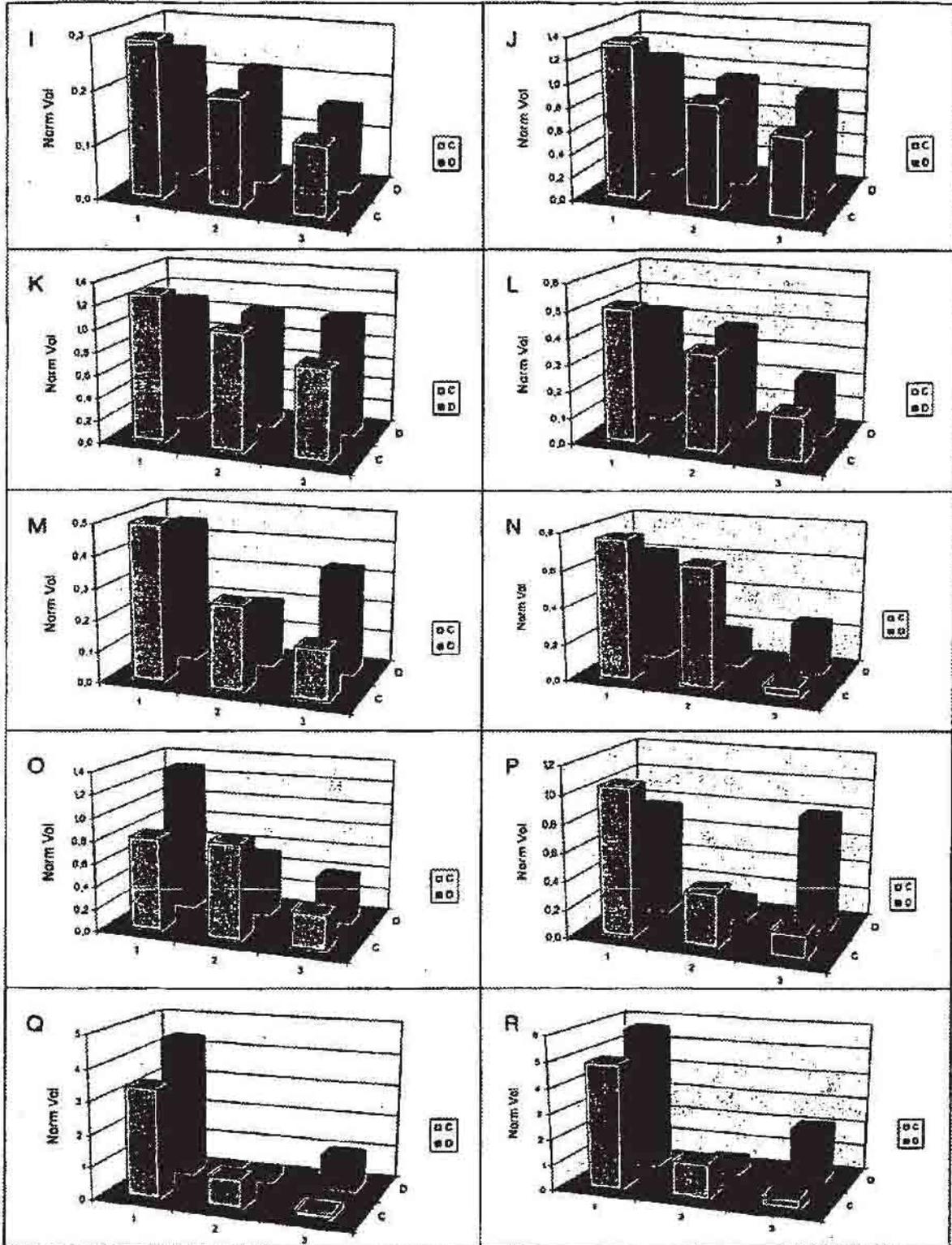
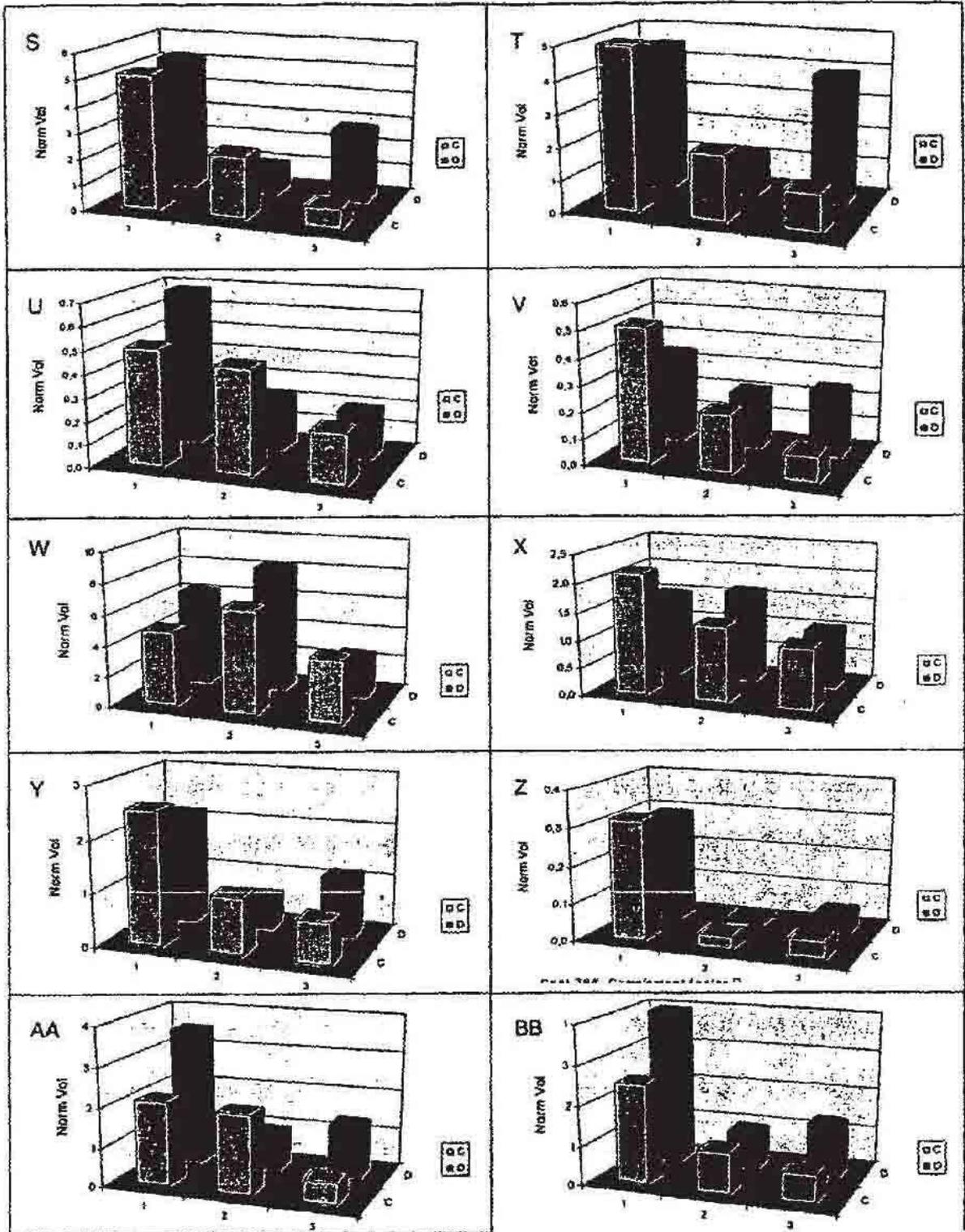


FIG. 5

FIG. 6







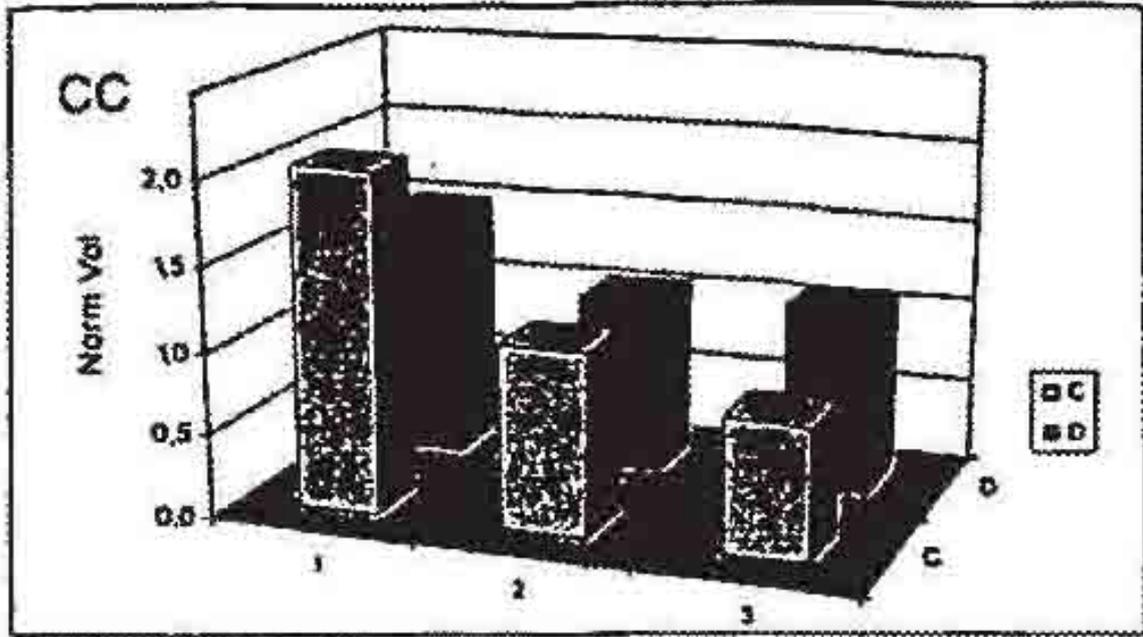
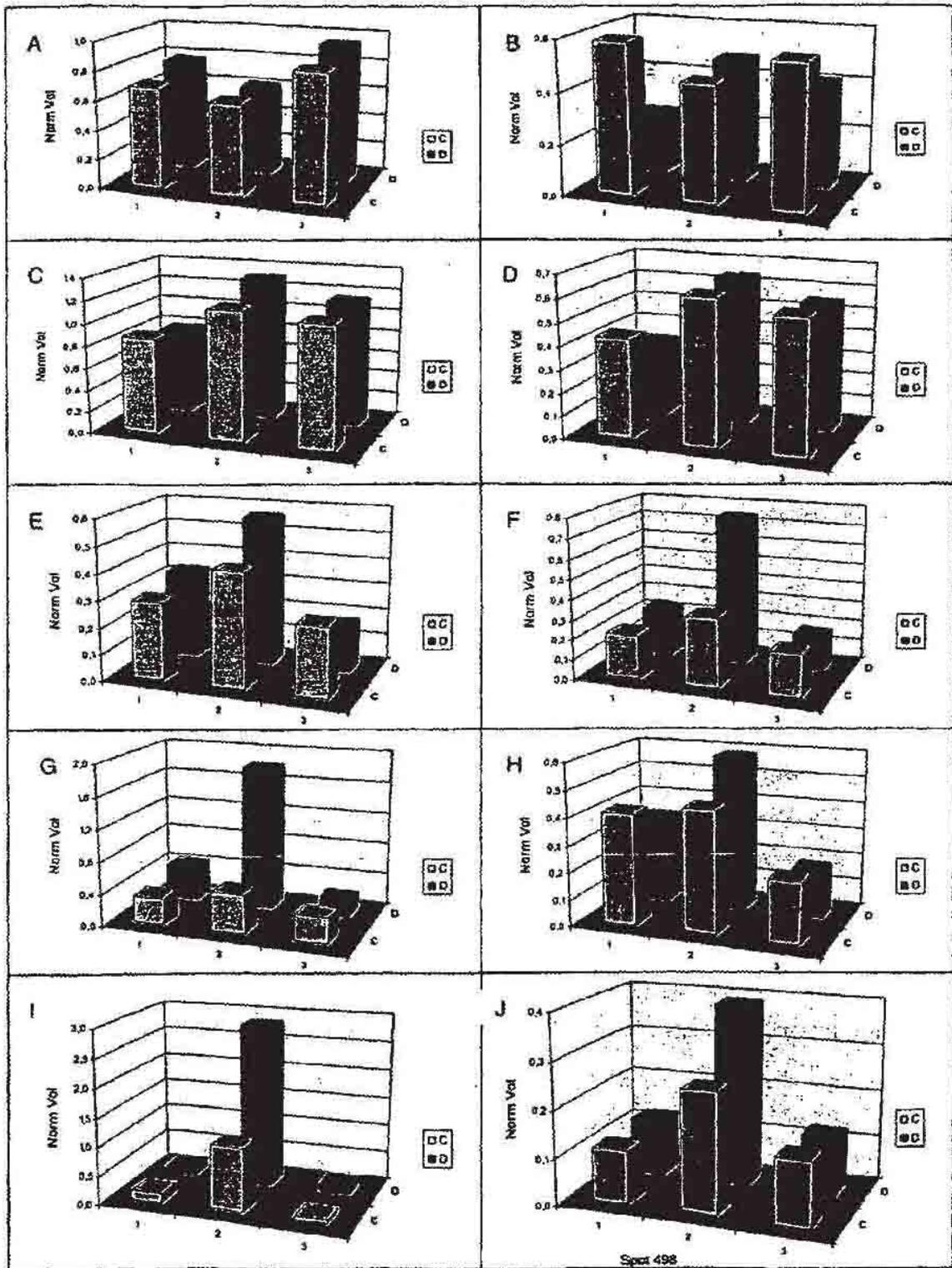


FIG. 7



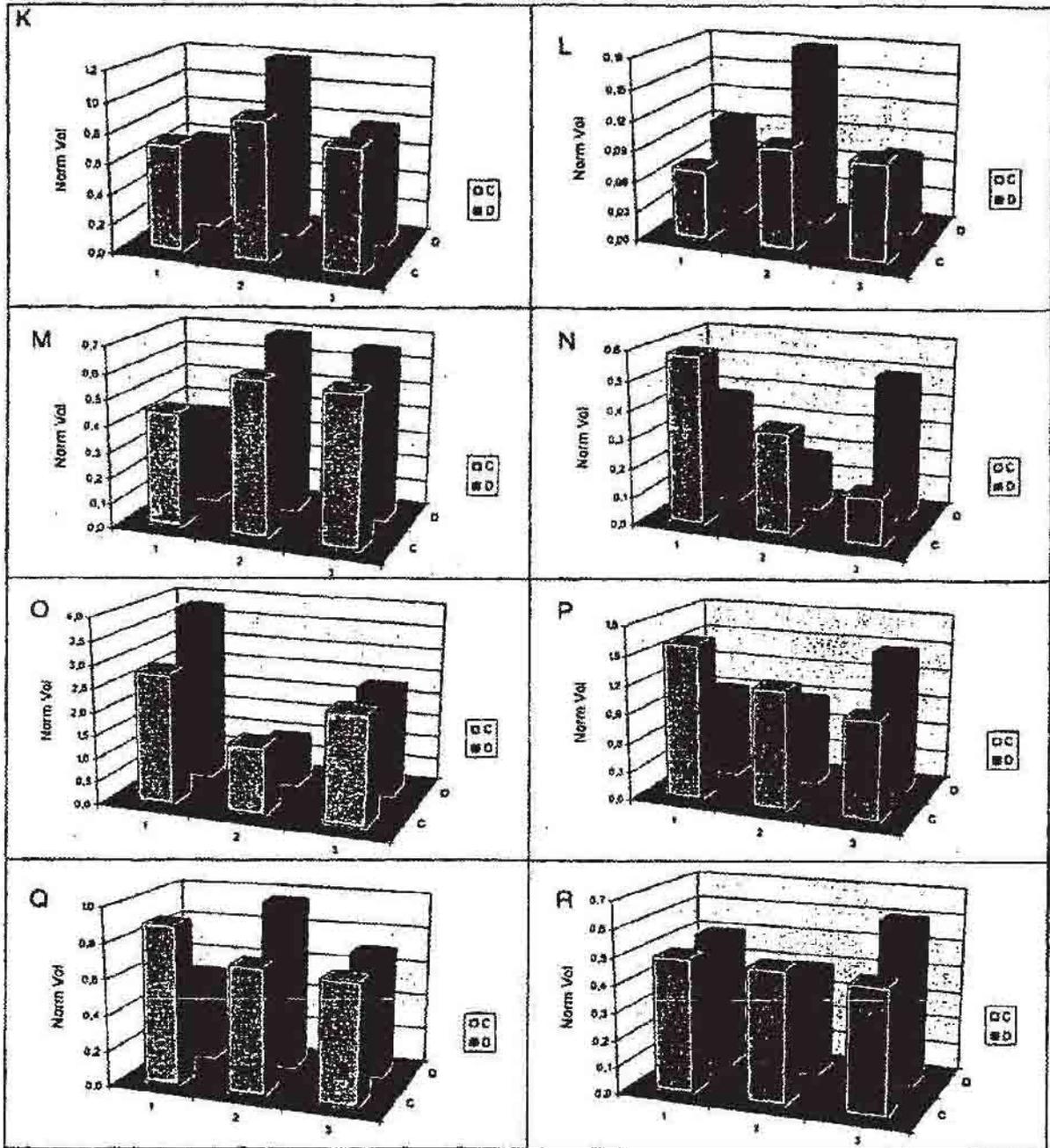


FIG. 8

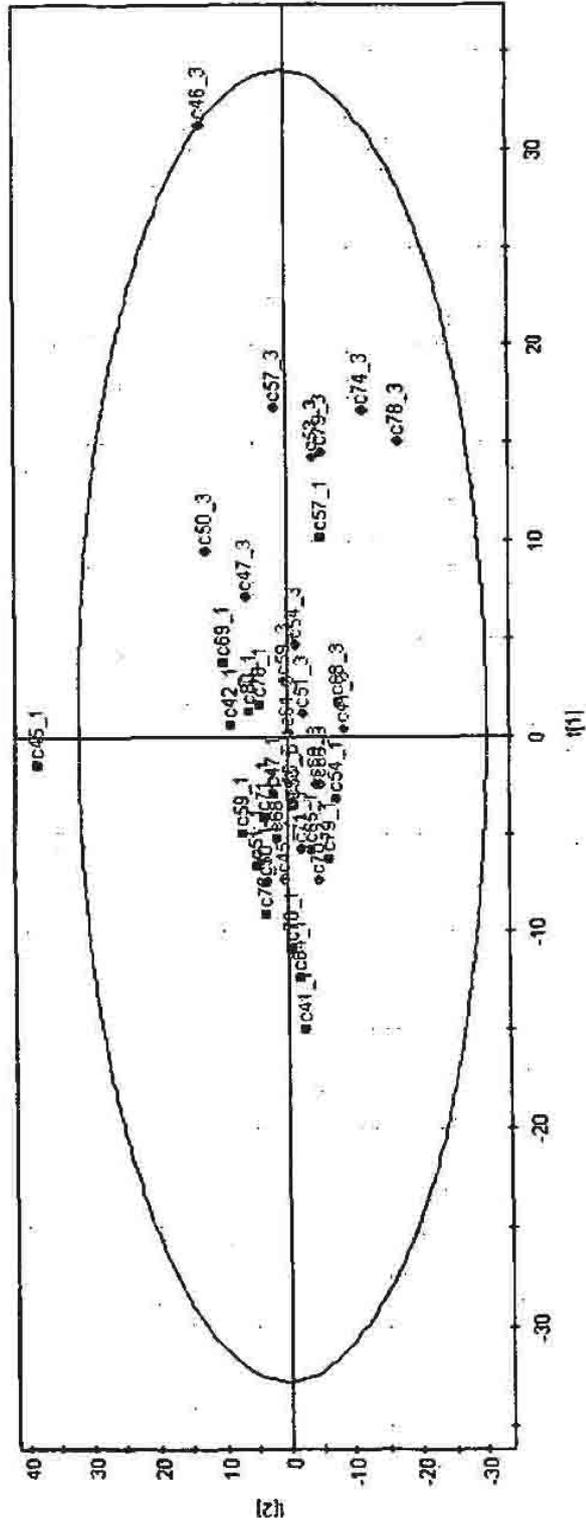


FIG. 9

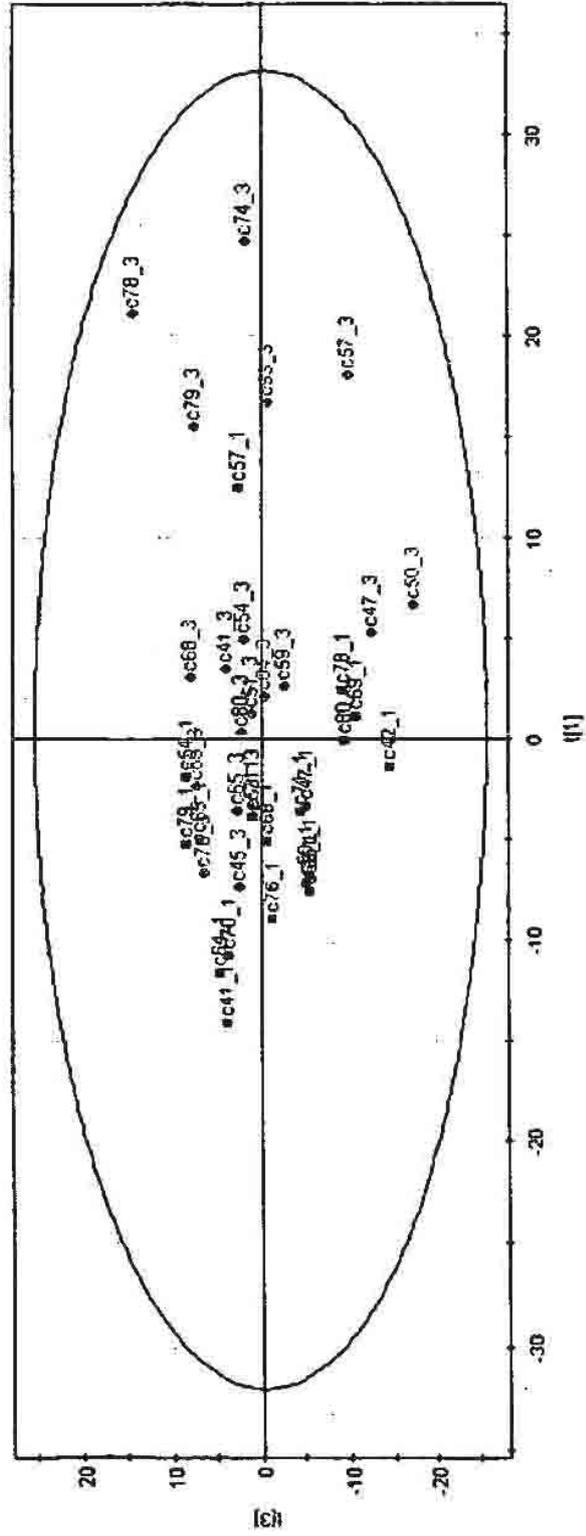


FIG. 10

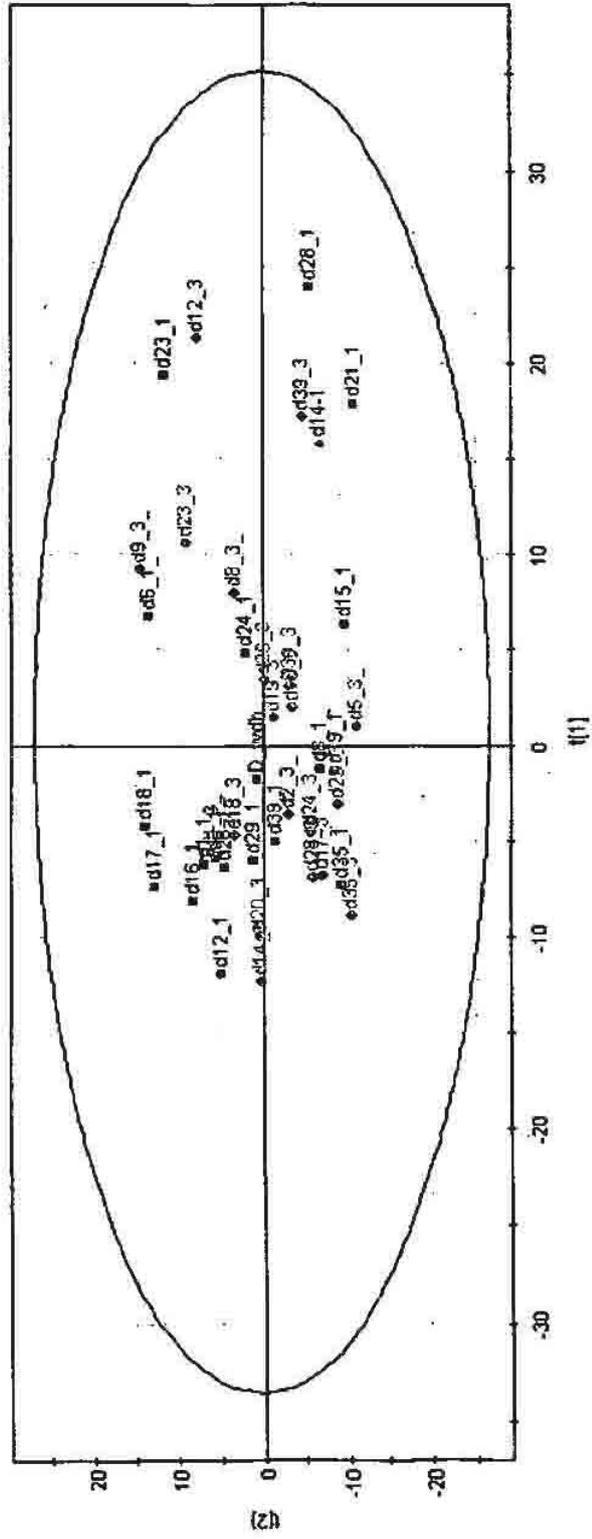


FIG. 11

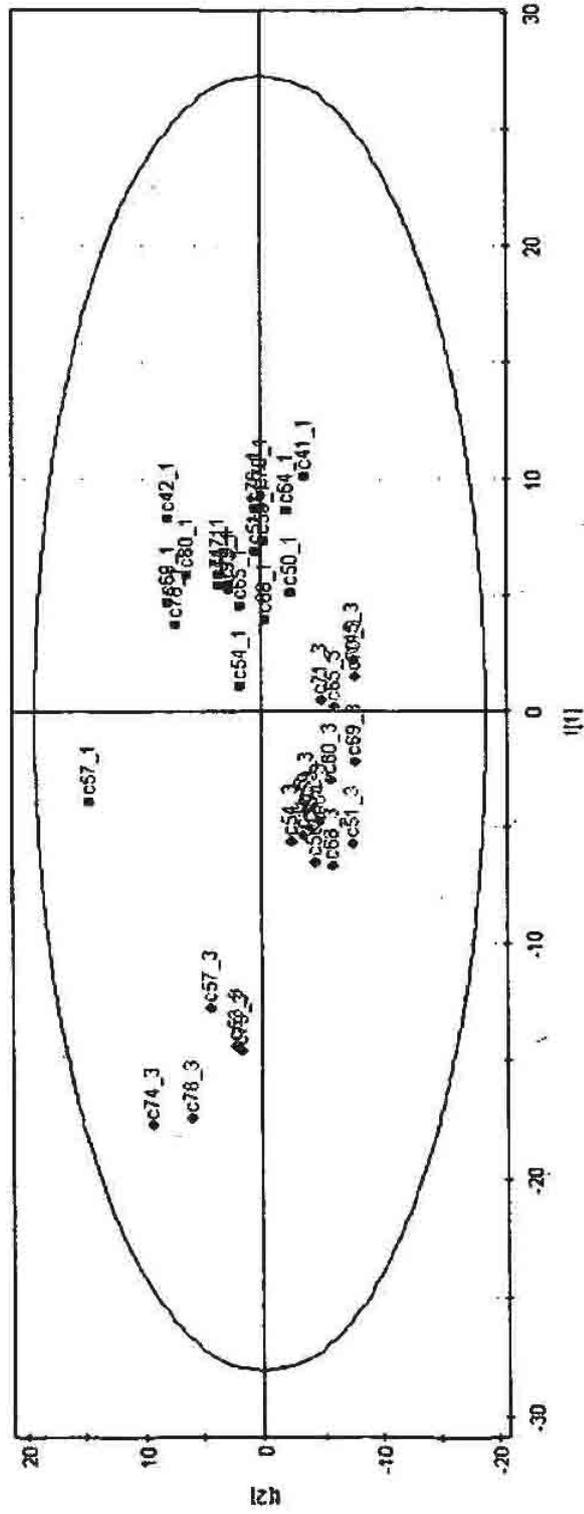


FIG. 12

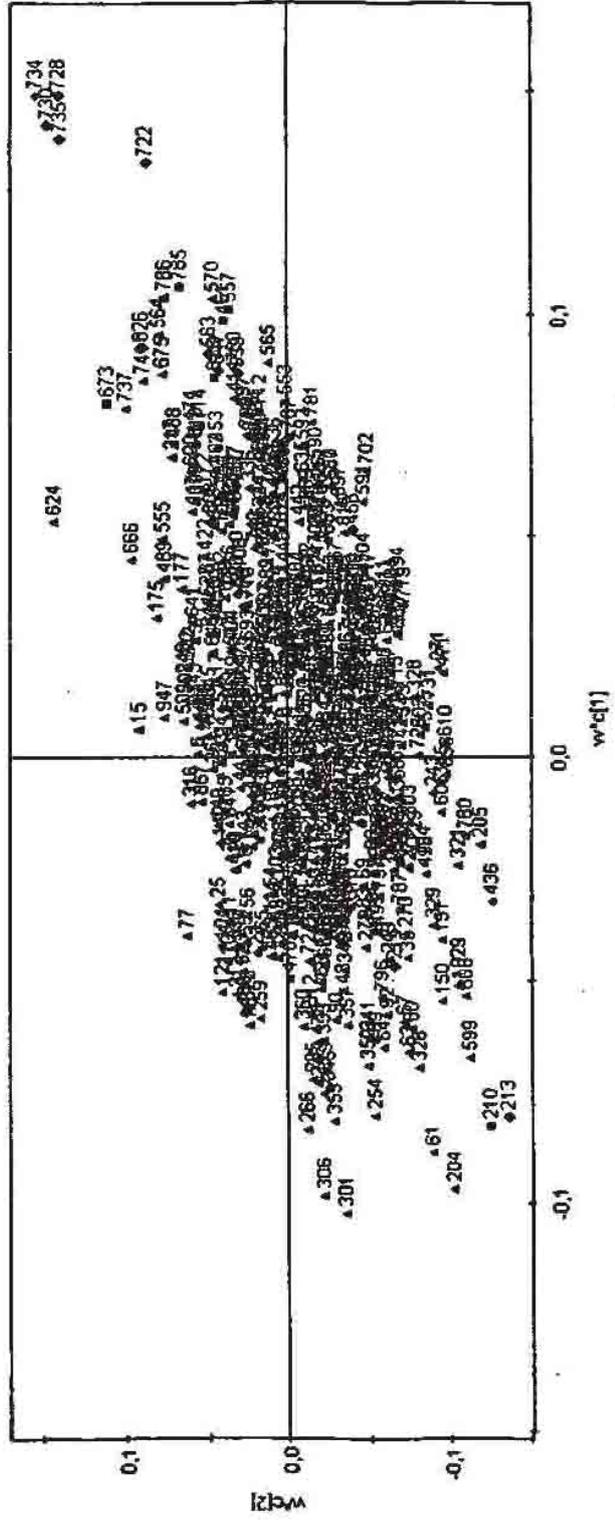


FIG. 13

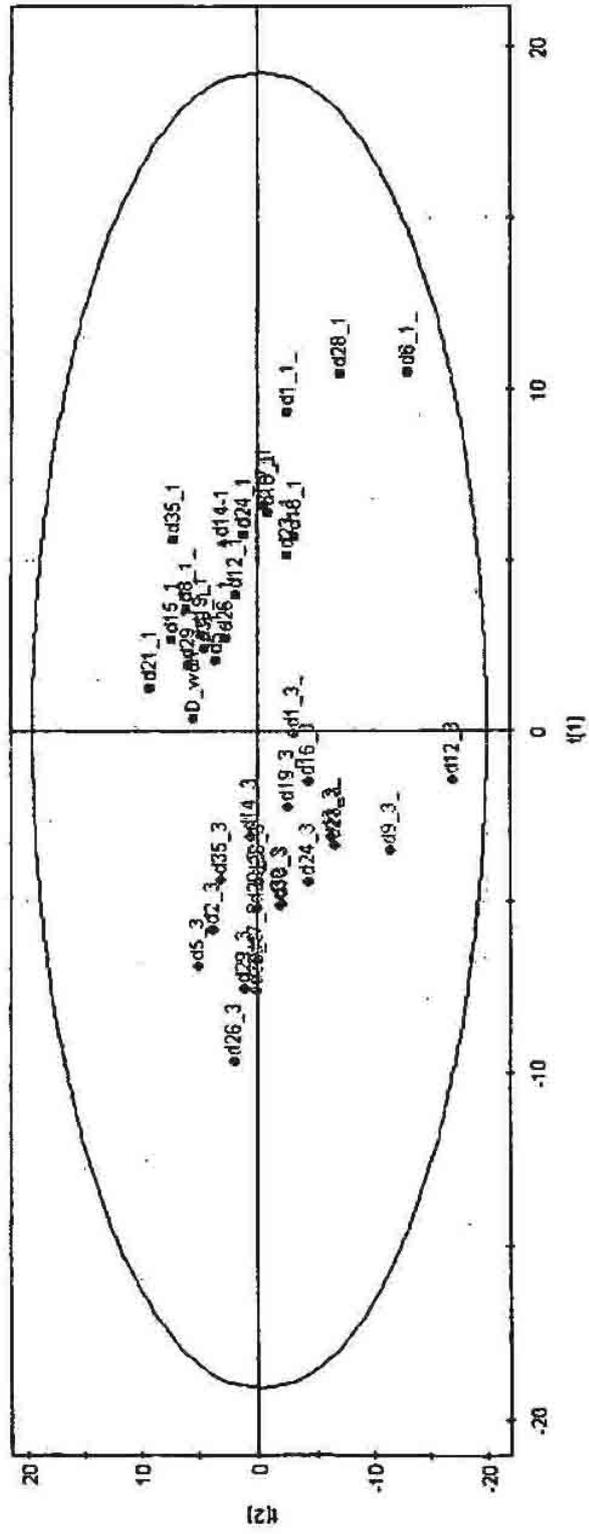


FIG. 15

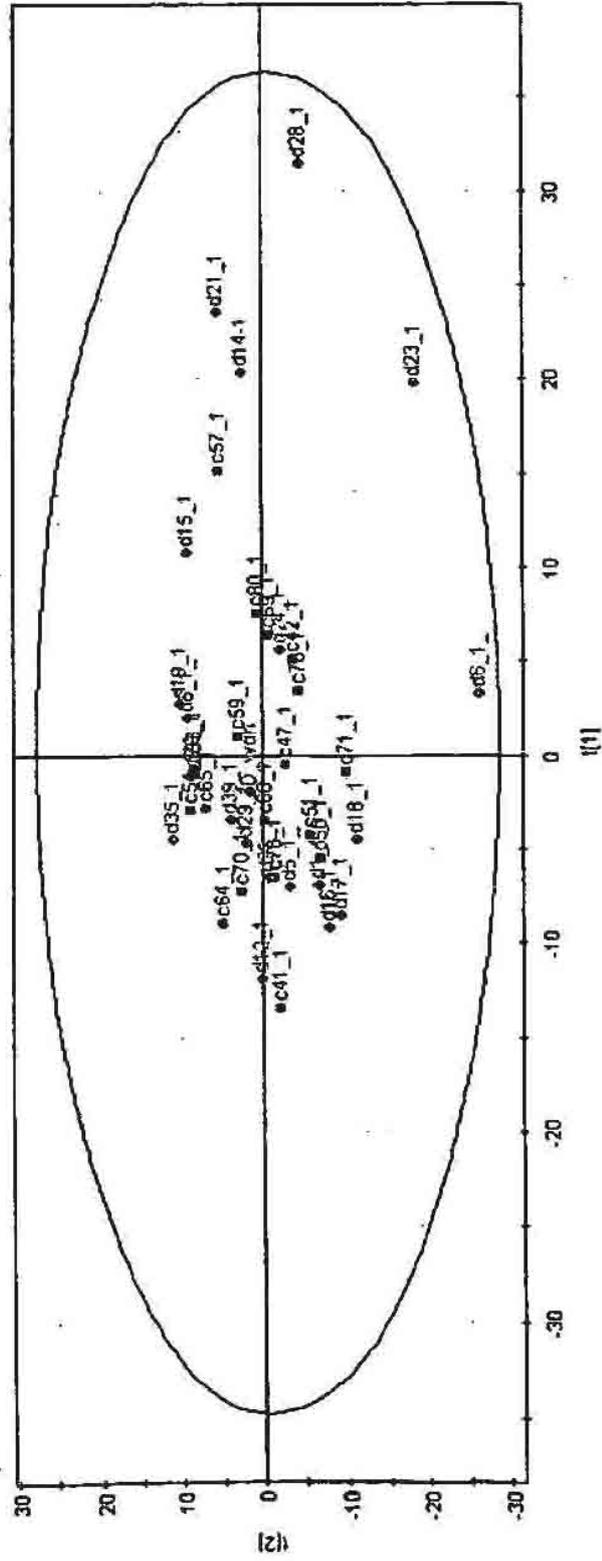


FIG. 17

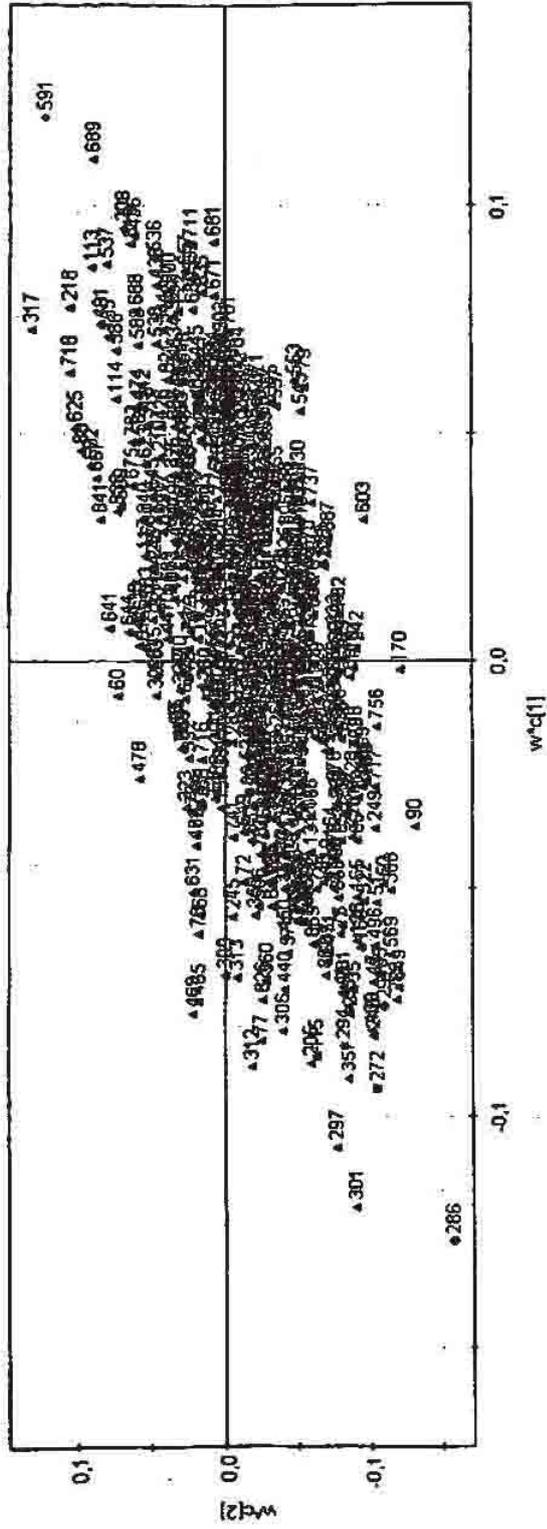


FIG. 19

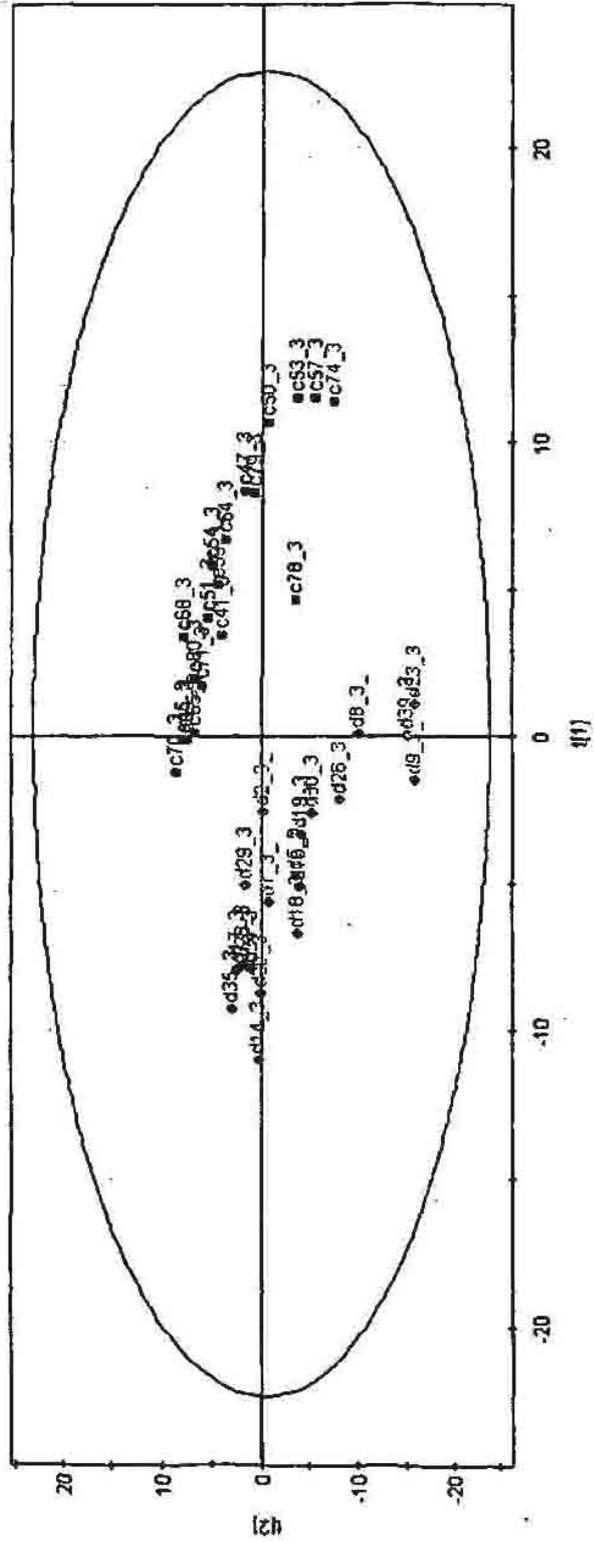


FIG. 20

