

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 432**

51 Int. Cl.:

C07K 14/74 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 7/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2008 E 08786687 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2310861**

54 Título: **Biomarcadores de riñón sano**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2015

73 Titular/es:

**QUEEN MARY AND WESTFIELD COLLEGE,
UNIVERSITY OF LONDON (33.3%)
Queen's Building, Mile End Road
London E1 4NS, GB;
HOSPITAL CLINIC I PROVINCIAL DE
BARCELONA (33.3%) y
INSTITUT DE INVESTIGACIONS BIOMEDIQUES
AUGUST PI I SUNYER (33.3%)**

72 Inventor/es:

QUINTANA PORRAS, LUIS, F.;
SOLE GONZALEZ, AMANDA;
BAÑÓN - MANEUS, ELISENDA;
CAMPISTOL, JOSEP, M y
RODRIGUEZ CUTILLAS, PEDRO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 534 432 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

Biomarcadores de riñón sano

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a biomarcadores urinarios para funcionamiento fisiológico renal sano de un riñón nativo o injertado.

Antecedentes de la invención

10 La búsqueda de biomarcadores urinarios sensibles del rendimiento de riñón ha atraído a esfuerzos importantes por su valor potencial como herramientas clínicas para detectar los primeros signos de diversas enfermedades. La reciente explosión de potentes técnicas proteómicas como ESI-MS, DESI-MS, MALDI-TOF-MS, SELDI-TOF-MS, DIOS-MS o LC-MS que permiten la detección de la muestra a través de una población de pacientes estadísticamente significativa, ha conducido al descubrimiento y la identificación de biomarcadores urinarios distintivos de la disfunción renal (Dihazi y col., Expert Rev Proteomics. 2007 Feb;4(1):39 - 50)

15 En esta línea, Jürgens M. y col., (Combinatorial Chemistry & high Throughput Screening, 2005, 8, 757 - 765) divulga una combinación de técnicas denominada globalmente tecnología peptidómica para la caracterización de peptidomas urinarios y la identificación de biomarcadores en orina.

En nefrología clínica, el éxito de la gestión de los pacientes de trasplante requiere la detección precoz y la aplicación de la terapia más apropiada. Los procedimientos de diagnóstico disponibles incluyen parámetros bioquímicos y biopsias, pero el único biomarcador no invasivo de la disfunción del aloinjerto es la creatinina insensible y no específica, que no permite la detección de cambios fibrosantes en una etapa temprana.

20 Los esfuerzos de investigación se han centrado en los biomarcadores urinarios de enfermedad. En un estudio clásico proteoma urinario se informó de que un enfoque proteómico no sesgado puede detectar picos de proteínas en orina asociados con el rechazo agudo del aloinjerto renal tubulointersticial. La identificación de estos picos de proteínas mediante espectrometría de masas demostró que todos ellos derivan de formas escindidas de beta-2-microglobulina, presumiblemente reflejo de las células dañadas de los túbulos proximales renales (Schaub y col., 2005. Am. J. Transplant. 5, 729 - 738). Muchos estudios han seguido esta tendencia, por nombrar algunos: Dihazi y col., Clin Chem. 2007 Sep; 53(9): 1636 - 45; O'valle y col., Transplant Proc. 2007 Sep; 39(7): 2099 - 101; Peng y col., J Int Med Res. 2007 Jul-Aug; 35(4): 442 - 9; documentos WO-07121922-A2 y WO-07104537-A2). El número de estudios publicados sobre biomarcadores urinarios está aumentando rápidamente, documento WO 2007/000466. En la mayoría de los estudios se ha analizado la fracción de proteína soluble en la orina, centrándose en la identificación de posibles marcadores biológicos en la enfermedad renal y en enfermedades del tracto urogenital. Incluyen estudios de lesión renal aguda, rechazo agudo del aloinjerto renal, enfermedad glomerular and carcinoma del riñón, vejiga y próstata. En muchos casos, los biomarcadores notificados siguen sin estar identificados, aunque en algunos estudios se han identificado algunas proteínas biomarcadores (O'Riordan y col., Am J Transplant 2007; 7:930 - 40; Schaub y col., 2005. Am. J. Transplant. 5, 729 - 738).

35 A pesar de estos esfuerzos, por el momento, las normas para una función renal sana no han sido objeto de ningún estudio. Tradicionalmente, se supone que la función renal es sana cuando un paciente no muestra signos de enfermedad o dolor. La monitorización de la función renal sana puede ayudar a la identificación de trastornos en una etapa temprana, pero, lo más importante es que proporcionaría a los médicos una potente herramienta para el manejo de pacientes con un riñón injertado.

40 Se conocen unas pocas proteínas urinarias que están presentes en muestras de individuos con función renal sana, pero sometidos a una fuerte reducción en la enfermedad. El ejemplo más destacado es la glicoproteína de Tamm-Horsfall (proteína TH), también conocida como uromodulina ((Kidney International, Vol. 16 (1979), pp. 279 -289; JBC Vol. 265, Nº 34, December 5, pág. 20764 - 20789, 1990). Generalmente, la proteína TH es la proteína más abundante en la orina y su presencia puede interferir con la detección de otras proteínas, si no se elimina (Pisitkun y col., 2004. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 13368 - 13373). Se puede despolimerizar mediante el uso de agentes reductores y de calentamiento. La proteína TH humana forma agregados de alto peso molecular y pueden disociarse en subunidades de peso molecular más pequeño de aproximadamente 100 kDa mediante varios agentes (Stevenson y col., Biochem J 116:791 - 796, 1970). Kobayashi K. y col., [Archives of Biochemistry and Biophysics Vol. 388(1), 2001:113 - 120] describen condiciones para solubilizar agregados de la proteína TH con el fin de mejorar la medición de esta proteína en las muestras de orina. Por lo tanto, es un uso habitual en el ámbito de descubrimiento de biomarcadores urinarios para liberar las muestras de orina de la uromodulina porque no le ha atribuido valor diagnóstico. No obstante, la uromodulina ha atraído cierto interés debido a sus propiedades antiinflamatorias. La solicitud de patente japonesa JP-2002125673-A divulga un nuevo gen humano de la uromodulina y sus usos como agente antiinflamatorio.

55 Otras proteínas urinarias abundantes son cininas. Mindroui y col. (J Biol Chem. 1986 Jun 5; 261(16):7407 - 11) compararon los tipos de cininas excretados en la orina fresca de perros, ratas y seres humanos usando cromatografía líquida de alto rendimiento. Descubrieron que en la orina humana, el contenido de cininas era de

aproximadamente un 12 % de la bradicinina, 30 % de Lys-bradicinina, 2 % de des-Arg1-bradicinina, y 41 % de una cinina entonces desconocida que era idéntica a la Lys-bradicinina, pero que tenía una alanina en la posición 4 en lugar de una prolina. La calicreína urinaria humana incubada con cininógeno de peso molecular bajo humano semipurificado liberó un 76 % de las cininas totales como Lys-bradicinina, 7 % como bradicinina, y 17 % como [Ala3] Lys-bradicinina. Por tanto, la lys-bradicinina es el tipo más abundante de cinina en la orina, sin embargo, y a pesar de su aplicación en la fisiopatología cardiovascular, de su presencia en la orina no se ha derivado ningún valor diagnóstico para la fisiopatología renal.

Un patrón que afirmara positivamente la idoneidad de una función renal injertada sería de gran utilidad para los clínicos en la detección precoz de cambios fibrosantes por lo demás no detectables.

10 Aprovechando las nuevas técnicas de LC-MS y debido a su innovadora estrategia para el descubrimiento de biomarcadores urinarios, los inventores han identificado nuevos péptidos urinarios naturales. Todos ellos muestran concentraciones reducidas en orina en la enfermedad que los hacen aptos como biomarcadores del funcionamiento renal sano. Por lo tanto, la presente invención proporciona al médico una herramienta clínica para diagnosticar, en lugar de suponer, una fisiología renal sana.

15 Sumario de la invención

La invención se refiere a los biomarcadores urinarios de la fisiología renal sana. Por lo tanto, la invención proporciona una herramienta biomédica para controlar la función renal sana.

20 De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la invención comprende péptidos urinarios aislados seleccionados del grupo que comprende las SEC ID N° 1 a 9 y combinaciones de los mismos para su uso como un biomarcador fisiológico de la función renal sana.

En otro aspecto, la invención comprende el uso del péptido urinaria aislado que comprende la SEC ID N° 10 como un biomarcador fisiológico de la función renal sana.

La función renal comprende la función de un riñón injertado. El uso comprende el uso en el pronóstico y / o diagnóstico de una nefropatía que comprende nefropatía crónica del aloinjerto.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un método para el seguimiento, pronóstico y diagnóstico de la fisiología renal, que comprende a) recoger una muestra de un fluido corporal de un sujeto. b) añadir un patrón interno para la cuantificación precisa. c) concentrar y desalar la muestra recogida. d) analizar el contenido peptídico mediante técnicas proteómicas. e) cuantificar el contenido de péptidos que comprenden las SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 10 y combinaciones de los mismos. f) comparar los valores obtenidos en la etapa e) para controlar los valores. g) aplicar los valores comparativos recopilados en la etapa f) en la evaluación o diagnóstico del funcionamiento fisiológico de un riñón.

35 La muestra comprende orina. El sujeto comprende pacientes de la terapia de trasplante renal. El patrón interno comprende un péptido marcado isotópicamente con la misma secuencia que el péptido analito pero incorporando isótopos estables de carbono, nitrógeno e hidrógeno. La técnica proteómica comprende ESI-MS, DESI-MS, DIOS-MS, SELDI-MS, MALDI-MS, LC / MS, LC-MS / MS en tandem y cualquier otra técnica basada en la espectrometría de masas de alto rendimiento y / o técnicas basadas en anticuerpos, incluyendo ELISA, matrices de proteínas / péptidos, matrices de anticuerpos o combinaciones de los mismos.

40 Otro aspecto de la presente invención comprende el uso del procedimiento para el seguimiento, pronóstico y diagnóstico de la fisiología renal en el seguimiento de la eficacia terapéutica del tratamiento de un paciente de una patología renal.

Un último aspecto de la invención comprende un kit para el diagnóstico *in vitro* de una nefropatía en una muestra de un fluido corporal de un individuo, que comprende: al menos una molécula capaz de unirse y / o reconocer al menos un péptido del grupo que comprende las SEC ID 1 - 10.

45 La muestra comprende orina. La molécula de unión comprende anticuerpos opcionalmente en una forma marcada o unida a una enzima. El anticuerpo se puede fijar a un soporte sólido.

Breve descripción de las figuras

50 **Figura 1. Estrategia cuantitativa sin marcador para la identificación de biomarcadores urinarios de CAD.** (A) Cromatogramas de iones pico base representativos y (B) cromatograma de iones extraídos (XIC) representativos de un ion a m / z 642,6 a lo largo de grupo de muestra indicado.

Figura 2. El análisis de agrupación jerárquica sin supervisión clasifica a los pacientes individuales según su fenotipo patológico subyacente. La figura muestra los árboles de agrupamiento jerárquico basado en los datos cuantitativos de polipéptidos urinarios de los subtipos de DCA (CAAR e IF / TA) y las muestras de control (SRT y cont.) considerando (A) todo el conjunto de datos y (B) los 500 iones moleculares

menos variables.

Figura 3. Los péptidos específicos derivados de uromodulina y cinina son biomarcadores para el diagnóstico de DCA. (A) Las intensidades iónicas de los péptidos mostradas corresponden a los valores medios dentro de un grupo de muestra. Los valores representan la media \pm DT. B) Las intensidades mostradas corresponden a la media de los todos los péptidos derivados de una sola proteína dentro de cada paciente individual. Los valores representan la media \pm DT.

Descripción detallada de las realizaciones

La presente invención es el resultado de los esfuerzos de cooperación en proteómica clínica para identificar nuevos biomarcadores urinarios que ayudan a los clínicos en el diagnóstico de una enfermedad y dar instrucciones en cuanto a qué terapia puede ser más adecuada para el paciente.

Los inventores diseñaron una innovadora estrategia sin marcadores en base a nuevas técnicas de LC-MS para proteómica cuantitativa. Esta estrategia, específica para el descubrimiento de biomarcadores, permitió la comparación de un número ilimitado de muestras de modo que se obtuvieron resultados estadísticamente válidos (Figura 1). A partir del análisis de las muestras de orina en una cohorte de 32 personas, los inventores identificaron 9 nuevos péptidos urinarios de origen natural que califican como biomarcadores de un funcionamiento renal sano porque su presencia se reduce claramente en individuos cuyas biopsias reflejan fibrosis intersticial y atrofia tubular, pero no mostraron cambios en la creatinina ni en la tasa de filtración glomerular o, por otro lado, signos de ninguna etiología específica. En la Tabla 1 se muestran los parámetros clínicos de las cohortes del estudio, incluyendo los grupos de control. La Figura 1B muestra un ejemplo representativo de un biomarcador urinario en diferentes etapas de la enfermedad. Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención comprende 9 nuevos biomarcadores peptídicos aislados de orina humana. Las secuencias de dichos biomarcadores corresponden a las SEC ID N° 1 - 9 divulgadas en el presente documento.

En el contexto de la presente invención, la expresión "péptido aislado" se refiere a un péptido contenido en una solución corporal que se ha separado del cuerpo humano; especialmente un péptido en fluidos excretorios tales como la orina.

En el curso de su estudio, los inventores identificaron algunos de estos péptidos como fracciones de tanto la proteína TH humana como de cininógeno. Sin embargo, anteriormente no se habían mostrado pruebas de la existencia de estos derivados de péptidos de origen natural. Además, no se ha atribuido a las proteínas de longitud completa un valor clínico o diagnóstico en nefrología.

Tabla 1: parámetros clínicos de las cohortes del estudio y grupos de control. (*) Prueba T Test NS entre los grupos FT/AT frente a RACA. FIAT = fibrosis intersticial y atrofia tubular sin otra etiología; RACA = rechazo crónico activo mediado por anticuerpos. TFG= tasa de filtración glomerular de la estimación de la creatinina en suero mediante modificación de la dieta en la enfermedad renal (MDER) Ecuación del estudio.

	Media \pm DT			
	DCA		Control	
	Grupo FI/AT	Grupo RACA	Receptores estables de transplante renal	Controles sanos
Número de muestra (n)	8	10	5	9
Edad (a)	51 \pm 10,69	47,22 \pm 17,07*	36,2 \pm 8	43 \pm 10
Creatinina (mg/dl)	3,2 \pm 1,68	2,98 \pm 1,64*	1,08 \pm 0,3	0,91 \pm 0,3
Proteinuria (g/24 h)	2,67 \pm 2,90	3,11 \pm 3,33*	0,20 \pm 0,05	0,11 \pm 0,02
TFG (ml/min/1,73 m ²)	28,88 \pm 17,65	33,44 \pm 12,05*	82,22 \pm 4	110 \pm 10

Como excepción, el péptido urinario que comprende la SEC ID N° 10 había sido previamente identificado y corresponde a Lys-bradicinina. Encuentra aplicación clínica como biomarcador para la hipertensión y en el desarrollo y progresión de la enfermedad cardiovascular y el cáncer. Sorprendentemente, como han demostrado los inventores, este péptido tiene una aplicación clínica nueva como biomarcador fisiológico de la función renal sana.

Por lo tanto, el concepto único de la invención descrito en la presente solicitud comprende "Biomarcadores de riñón sano", algunos de los cuales son completamente nuevos; otro que es nuevo en su aplicación industrial. De acuerdo con lo anterior, otro aspecto, la invención comprende el uso de un péptido urinario aislado que comprende la SEC ID N° 10 como un biomarcador fisiológico de la función renal sana.

Debido a que el control de idoneidad de la función es de particular interés clínico en pacientes con un riñón injertado, otro aspecto de la presente invención comprende el uso de cualquiera de los péptidos urinarios aislados del grupo que comprende las SEC ID N° 1-10 o combinaciones de los mismos como biomarcadores en el control de la función

renal de un aloinjerto renal.

Con el fin de ayudar mejor a un médico a llegar a un diagnóstico o a decidir una terapia personalizada más adecuada, otro aspecto de la presente invención comprende el uso de los péptidos urinarios aislados del grupo que comprende las SEC ID N° 1 - 10 o combinaciones de los mismos en el pronóstico y / o diagnóstico de una nefropatía. Especialmente, cuando la nefropatía es la nefropatía crónica de aloinjerto.

La Fig. 3A (panel superior) muestra que los péptidos derivados de la uromodulina son significativamente más abundante en los pacientes de control que en los otros grupos (control frente al rechazo crónico activo mediado por anticuerpos (RACA), $p < 0,0001$). De los péptidos derivados del cininógeno, los de bradisinina (con dos estados de carga diferentes) fueron más abundantes en los pacientes trasplante renal estable (TRE) y control que los pacientes de disfunción crónica del aloinjerto (DCA) (figura 3, panel central). El análisis de la expresión de péptidos específicos de uromodulina y cininas en pacientes individuales reveló que los péptidos uromodulina eran consistentemente más abundantes en los grupos control y de TRE que en los grupos de DCA (Figura 3B). Se alcanzó una mayor sensibilidad considerando la intensidad media de todos los péptidos derivados de uromodulina. De hecho, este valor podría identificar correctamente el 94 % (17/18) de los pacientes con DCA con un 100 % de especificidad (ninguno del grupo control tenía niveles bajos de péptidos de uromodulina, Fig. 3B). Así, una combinación de biomarcadores tenía una potencia más discriminatoria que cualquiera de los biomarcadores individuales que los inventores han identificado, y este hecho argumenta que el uso de la mezcla de los biomarcadores identificados aquí aumentaría la especificidad y la sensibilidad del diagnóstico precoz de la DCA.

Por tanto, de acuerdo con la presente invención, los péptidos derivados de uromodulina y bradisinina son biomarcadores específicos de un riñón sano, cuya presencia podría usarse para discriminar a los pacientes de DCA y los individuos no afectados.

Sería deseable proporcionar un protocolo clínico para la monitorización de pacientes en nefrología de acuerdo con el uso de biomarcadores riñón sano de la presente invención. Por lo tanto, otro aspecto de la invención comprende un procedimiento para el control de la fisiología renal que comprende a) recoger una muestra de un fluido corporal de un sujeto; b) añadir un patrón interno para la cuantificación exacta.

c) concentrar y desalar la muestra recogida; d) analizar el contenido peptídico mediante técnicas de proteómica; e) cuantificar el contenido de los péptidos seleccionados del grupo que comprende las SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEQ ID NO : 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 10 y combinaciones de los mismos; f) comparar los valores obtenidos en la etapa d) con los valores de control; g) aplicar los valores comparativos recogidos en la etapa e) en la evaluación o diagnóstico del funcionamiento fisiológico del riñón.

Para hacer que la técnica sea cuantitativa, el procedimiento incluye la adición de un patrón interno después de recoger la muestra y antes de realizar cualquiera de las etapas. En una realización preferida, el patrón interno es un péptido marcado isotópicamente con la misma secuencia que el péptido analito a cuantificar pero incorporando isótopos estables de carbono, nitrógeno e hidrógeno. Estos isótopos no son radiactivos, pero permiten una cuantificación exacta en unidades absolutas (por ejemplo. mol/l o mg/ml) para servir en su aplicación clínica.

El procedimiento de la presente invención es especialmente adecuado para su uso en un protocolo no invasivo de monitorización de pacientes. En consecuencia, una realización preferida de la invención comprende el procedimiento descrito en el presente documento, en el que la muestra de fluido corporal es orina. Adicionalmente, el procedimiento de la presente invención es particularmente útil en el campo del trasplante renal. De acuerdo con lo anterior, otra forma de realización preferida comprende el procedimiento descrito en el presente documento, en el que el sujeto es un paciente de la terapia de trasplante renal.

Una vez que los péptidos de la presente invención se han identificado en la orina, se pueden aplicar varias técnicas proteómicas en la realización del procedimiento de la presente invención. Por tanto, una forma de realización preferida de la invención comprende un procedimiento que comprende técnicas proteómicas elegidas del grupo que comprende ESI-MS, DESI-MS, DIOS-MS, SELDI-MS, MALDI-MS, LC / MS, LC-MS / MS en tándem y cualquier otra técnica basada en la espectrometría de masas de alto rendimiento y / o técnicas basadas en anticuerpos, incluyendo ELISA, matrices de proteínas / péptidos, matrices de anticuerpos o combinaciones de los mismos.

Los pacientes que han sufrido un trasplante de riñón reciben un tratamiento inmunosupresor constante complementado a veces con otras sustancias específicas para ayudar y mejorar la idoneidad del aloinjerto. A menudo, después del trasplante, las terapias deben revisarse y personalizarse para cada paciente individual. A la hora de ayudar a los clínicos a decidir una terapia más adecuada, una forma de realización preferida del procedimiento de la presente invención comprende su uso en el seguimiento de la eficacia terapéutica del tratamiento de un individuo.

Sería deseable un procedimiento rápido y fácilmente aplicable para el control continuo de la función renal de un paciente. De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la presente invención comprende un kit para el diagnóstico in vitro de una nefropatía en una muestra de un fluido corporal de un individuo que comprende al menos una molécula capaz de unirse y / o reconocer de al menos un péptido del grupo que comprende las SEC ID N° 1 - 10.

Una realización preferida de la invención comprende un kit en el que la muestra utilizada es la orina y la molécula de unión es un anticuerpo, opcionalmente marcado o vinculados a una enzima. Tal realización puede comprender además un componente sustancial, incluyendo un soporte sólido en el que un anticuerpo capaz de unirse a y reconocer una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N° 1 – 10 y combinaciones de los mismos está unida o fijada a dicho soporte sólido. En algunas realizaciones, el soporte sólido es una tira de ensayo adecuado para sumergir en una solución de orina.

Además, el kit de la presente invención puede incluir reactivos de detección, tampones o dispositivos. En realizaciones preferidas, el kit contiene todos los elementos necesarios para llevar a cabo un ensayo de detección. Incluyendo todos los controles, instrucciones para realizar los ensayos y el hardware o el software necesario para el análisis y presentación de resultados.

En algunas realizaciones, los kits contienen un ensayo en un formato de tira de ensayo. Los kits pueden ser diseñados para su uso en un entorno clínico, un entorno de laboratorio o en el entorno del hogar del paciente.

Ejemplo 1

Cohortes de estudio

En el presente estudio se incluyeron treinta y dos individuos: 18 pacientes con caracterización clínica e histopatológica de DCA y 14 controles. Los pacientes se dividieron en dos grupos: 1) ocho pacientes (cinco varones y tres mujeres) con fibrosis intersticial y atrofia tubular (FI / AT) y sin signos de de cualquier etiología específica (**grupo de FI / AT**); 2) 10 pacientes (siete varones y tres mujeres) con rechazo activo crónico mediado por anticuerpos (RACA) definido por características morfológicas que incluyen glomerulopatía por trasplante (GT) y FI/AT con o sin pérdida de capilares peritubulares, y engrosamiento fibroso de la íntima en las arterias sin duplicación de la elástica interna, depósito de C4d difuso en los capilares peritubulares y presencia de anticuerpos específicos de donantes (**grupo RACA**).

Todos los receptores de trasplante recibieron tratamiento inmunosupresor con un inhibidor de la calcineurina, micofenolato mofetil y prednisona. No hubo diferencias significativas entre los grupos de FI / AT y RACA con respecto a la edad, el sexo, la duración de la diabetes, la presión arterial, el índice de masa corporal y la TFG (tabla 1), pero se clasificaron en estos subgrupos de DCA de acuerdo con criterios histopatológicos (Tabla 2).

Los controles se dividieron en dos grupos: 1) **Receptores estables de trasplante renal**: cinco receptores de donante vivo de un primer injerto renal después del tratamiento inmunosupresor con tacrolimus, micofenolato mofetil y prednisona; y 2) **controles sanos**: 9 voluntarios con presión arterial normal (presión arterial sistólica <130 mmHg y presión arterial diastólica <80 mmHg), y sin antecedentes de diabetes mellitus, cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular o enfermedad vascular periférica. La Tabla 1 muestra la característica basal de los pacientes con DCA y los controles.

El estudio fue aprobado por la junta de revisión institucional en el Hospital Clínico de Barcelona y tanto los pacientes como los controles dieron su consentimiento informado para la recogida y análisis de orina.

Histopatología

Las biopsias de trasplante consistían en dos núcleos obtenidos con agujas de calibre 18 usando guías de ultrasonidos por indicación clínica. Se prepararon secciones de parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina, tricrómico, ácido peryódico de Schiff y ácido peryódico de Schiff-metenammina plata. Se analizaron las biopsias y fueron puntuadas de acuerdo con la clasificación de Banff por un patólogo que desconocía los resultados de los estudios moleculares (27). Se diagnosticó GT con microscopía óptica en base a los dobles contornos de las membranas basales glomerulares (MBG) (28) y respaldado por estudios de inmunofluorescencia, que mostraron hallazgos de inmunofluorescencia negativa, IgM y/o C3. La capilaritis peritubular en biopsias de GT se clasificó de acuerdo con los criterios cuantitativos de la última actualización de Banff (27). La tinción de C4d se realizó en todas las biopsias utilizando tejido congelado. A las secciones congeladas se añadieron ant-humanos monoclonales murinos C4d 100 (Quidel Corporation, San Diego, CA), seguido de antiseros fluorescentes (IgG de cabra anti-ratón AffiniPure conjugada con CyTM2, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA).

No hubo signos de RACA o de glomerulopatía por trasplante (GT) y C4d fue negativo en todos los pacientes con pura FI / AT. La puntuación media de doble contorno glomerular (CG) fue de 1,89 y C4d fue positivo en todos los pacientes en el grupo de RACA. Los signos de rechazo crónico activo mediado por linfocitos T se excluyeron en todas las muestras de este grupo. La tabla 2 resume las puntuaciones de Banff en los grupos de FI / AT y RACA.

Preparación y purificación de muestras

Se recogieron cincuenta mililitros de orina de la mañana inmediatamente antes de la biopsia renal. Se añadió un cóctel inhibidor de la proteasa (Complete Mini, Roche, Mannheim, Alemania) y las muestras se congelaron rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. Las muestras de orina se concentraron y se separaron de las sales inorgánicas mediante extracción en fase sólida utilizando una HLB de fase inversa Oasis 94226 (Waters, Milford, MA) como la fase estacionaria esencialmente como se ha descrito(12) con modificaciones

menores. Brevemente, los cartuchos se acondicionaron con 10 ml de 100 % de acetonitrilo (ACN) y se equilibraron con 10 ml de 0,1 % DE ácido trifluoroacético (TFA) / 5 % de ACN. Después de cargar 1 ml de muestra (acidificada con 0,1 % de TFA a pH 3 y una concentración final de 5 % de ACN), el lecho del cartucho se lavó con 10 ml de 0,1 % de TFA / 5 % de ACN y después eluyeron los péptidos con 2 ml de 0,1 % de TFA / 60 % de ACN. La separación de sales orgánicas se realizó mediante intercambio de cationes fuertes (SCX) usando perlas magnéticas (Dyna Beads, Invitrogen) del siguiente modo. Las perlas se acondicionaron con NaCl 1 M / bicarbonato de amonio 50 mM a pH 8,8 y se equilibraron con solución de carga (0,1 % de TFA / 20 % de ACN). Después de la aplicación de la muestra de la etapa de fase inversa, los péptidos unidos se lavaron 3 veces con solución de carga. La elución se realizó con acetato de amonio 500 mM en 20 % de ACN. Péptidos eluidos se secaron en un SpeedVac y se almacenaron a -80 °C.

Espectrometría de masas

Los péptidos secos se disolvieron en 10 μ l de 0,1 % de TFA / 2 % de ACN y el 10 % de esta solución se analizó en un sistema LC-MS/MS que consistía en un cromatógrafo de líquidos de nanoflujo a presión ultraalta (Acquity, Waters/Micromass) conectado en línea con un espectrómetro de masas Q-TOF Premier (Waters / Micromass) equipado con una fuente de iones nanoESI. Las separaciones se realizaron en una columna BEH de 100 μ m x 100 mm (Waters / Micromass) a un caudal de 400 μ l/ min con una retropresión de operación de aproximadamente 20,7 MPa. Los recorridos de gradiente fueron de 2 % de B a 30 % de B en 30 minutos, seguido de un lavado de 5 minutos a 80 % de B y una etapa de equilibrado de 7 minutos a 2 % de B. El disolvente A fue ácido fórmico al 0,1 % en agua de calidad LC-MS (Optigrade, LGC, Reino Unido) y el disolvente B fue ácido fórmico al 0,1 % en ACN de calidad LC-MS (Optigrade, LGC, UK). Para los experimentos de LC-MS / MS, a las exploraciones de MS de 500 ms les siguieron 3 exploraciones de MS / MS (500 ms cada uno), que se desencadenaron en modo dependiente de los datos cuando los iones de carga múltiple en los registros de las exploraciones de MS estaban por encima de 15 conteos / s. Los análisis de LC-MS se realizaron mediante la adquisición de exploraciones de 1 s (no hay funciones de MS / MS), pero con, por otro lado, los mismos parámetros de LC y MS que para los experimentos de LC-MS / MS.

Análisis de Datos

Quantificación. Las listas de iones seleccionados para MS / MS se introdujeron en Pescal, un programa escrito de forma interna para la automatización de los análisis de datos de LC-MS sin marcador (4). A continuación, PESCAL usó m / z y el tiempo de retención (tR) de los iones detectados para construir cromatogramas de iones extraídos (XICS) de las carreras de la LC-MS de muestras de orina individuales. Las ventanas para la construcción de XIC fueron de 25 ppm y 2 minutos para m / z y el tR, respectivamente. Los valores de intensidad (áreas y alturas de los picos) de estas XICS se analizaron en los archivos de Excel para la normalización y la manipulación estadística y análisis. Los valores de intensidad de los picos se normalizaron conforme a las intensidades medias de todos los picos dentro de una muestra y después a la media del ion del péptido individual en las muestras.

Análisis estadísticos. Para el análisis por agrupación sin supervisión, los valores normalizados de intensidad de iones se convirtieron en log y se introdujeron en el software Cluster (software Eisein, (29) para el agrupamiento y TreeView (software Eisein) para la visualización de los resultados de la agrupación.

Se usó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para deducir la significación estadística de los resultados de la LC-MS. Estos análisis se realizaron utilizando un paquete estadístico comercial (Prism).

La significación estadística de las pruebas de química clínica se infiere mediante la prueba t de Student. Los niveles relativos de los iones de polipéptidos también se analizaron mediante análisis discriminante (Systat, versión 10. 2, Richmond, CA, EE. UU.) para identificar las combinaciones de estos polipéptidos que mejor discriminan entre los estados de enfermedad. También se construyó un modelo de regresión logística con los mismos iones de polipéptidos para calcular las puntuaciones de predicción para cada muestra, lo que permite a los inventores construir una curva de la característica operativa del receptor (ROC) basada en estos valores (30).

Análisis de los datos de EM/EM La identidad de un subconjunto de péptidos detectados se determinó mediante búsqueda de espectros de MS / MS contra la base de datos humana Índice Internacional de Proteínas (IPI) (versión 3v. 44) utilizando el motor de búsqueda MASCOT. Las búsquedas se limitaron a 50 ppm y 100 ppm para los iones parentales y de los fragmentos, respectivamente. No se seleccionó restricción enzimática. Las coincidencias se consideraron significativas cuando estaban por encima del umbral estadístico significativo (como los devueltos por MASCOT) y al menos dos péptidos coincidieron con una entrada de proteína.

Resultados

Pacientes

El objetivo era identificar péptidos urinarios que pudieran servir como biomarcadores de DCA. Para ello, en este estudio se incluyeron 14 controles y 18 muestras con características clínicas bien definidas (Tabla 1). Como se describe en más detalle anteriormente, los parámetros histopatológicos clasificaron al grupo de pacientes en dos subgrupos: FI/AT y RACA (Tabla 2).

Estrategia analítica

Con el fin de aumentar las probabilidades de identificar biomarcadores útiles de DCA, el objetivo de los inventores era cuantificar péptidos urinarios en las muestras tan exhaustiva y exactamente como sea posible. Para ello, los inventores usaron una estrategia analítica que consistía en utilizar los perfiles de elución de los iones de péptidos individuales en las carreras de LC-MS que habían sido detectados previamente en los experimentos de LC-MS/MS. Por tanto, esta es una estrategia de cuantificación dirigida porque los inventores solo cuantificaron (mediante LC-MS) los iones que habían sido detectados anteriormente (aunque no necesariamente identificados) en orina mediante LC-MS / MS dependiente de datos. Con el fin de generar una lista de péptidos urinarios cuantificables, los inventores agruparon los péptidos urinarios no digeridos del mismo grupo de pacientes y los analizaron mediante LC-MS / MS. Estos análisis se realizaron por triplicado (tres veces por grupo de muestra), incluyendo cada experimento de LC-MS/MS duplicado la lista de péptidos identificados en las carreras de LC-EM/EM previas como listas de exclusión, como se ha indicado anteriormente. Estos experimentos tuvieron como resultado la selección de 6.250 iones de carga múltiple para MS / MS. Cabe señalar que esta era una lista sin filtrar y muchos de estos iones se detectaron en más de un conjunto de muestras. La cuantificación se realizó a partir de los datos de LC-MS de muestras individuales (sin combinación) mediante cuantificación dirigida de los 6.250 iones que habían sido seleccionados para la cuantificación mediante LC-MS/MS dependiente de datos.

Para ilustrar cómo funciona esta estrategia analítica, la Fig. 1A muestra cromatogramas de iones de LC-EM representativos de péptidos extraídos de la orina de donantes con FI/AT, RACA, TRE y control. Cada uno de los picos en estos cromatogramas se formó mediante la elución de varios polipéptidos y, por lo tanto, por sí mismos, que no se puede usar para cuantificar péptidos individuales. Para la cuantificación, los inventores calcularon el área bajo la curva de un cromatograma obtenido a partir del perfil de elución de cada péptido individual (es decir, y el cromatograma de iones extraídos, XIC), un ejemplo de la cual se muestra en la Fig. 1B. Con el fin de hacer que este enfoque sea práctico, los inventores usaron un programa informático interno para automatizar la creación de estos XICS. El programa también calcula sus intensidades (4). En el ejemplo ilustrativo mostrado en la Fig. 1B, había presente un ion molecular a m/z 642,6 con un enriquecimiento de aproximadamente 5 veces en las muestras de orina de RACA en comparación con las de FIAT y de al menos 15 veces en comparación con las muestras de la TRE y de control (Fig. 1 B).

La agrupación jerárquica de los datos cuantitativos LC-MS sin marcador clasifica los peptidomas urinario de acuerdo con su fenotipo patológico subyacente

Como se ha mencionado anteriormente, usando esta estrategia los inventores identificaron ~ 6.250 iones en sus análisis antes de filtrar y 2.300 después de eliminar los duplicados; y para todos ellos los inventores obtuvieron XICS y calcularon sus intensidades en 14 controles y 18 muestras de DCA. La Fig. 2A muestra que era posible separar los pacientes control de los de RACA en base a la agrupación jerárquica sin supervisión usando las intensidades de todos los péptidos identificados, mostrando SRT y FIAT cierta superposición. El filtrado de los datos para incluir los 500 iones de péptidos menos variables tuvo como resultado un patrón de agrupamiento similar (compárense las Fig. 2B y 2C), pero TRE y control estaban completamente separados de RACA en el análisis mostrado en la Fig. 2B (sólo se consideraron 500 péptidos), mientras que un paciente de TRE se colocó en el grupo de RACA/FIAT cuando se incluyeron en el análisis todos los iones de péptidos (Fig. 2A). Un filtrado adicional para incluir un número menor de péptidos para la agrupación jerárquica dio resultados similares como en la figura 2B (datos no mostrados). Estos resultados indican que la composición polipeptídica en la orina de pacientes de RACA es significativamente diferente de la de los sujetos de TRE y de control y que la estrategia cuantitativa de LC-MS sin marcador de los inventores puede detectar estas diferencias.

Identificación de los péptidos específicos derivados de uromodulina y cininas como biomarcadores específicos para el diagnóstico de DCA.

Con el fin de caracterizar con más detalle las diferencias moleculares entre estas muestras, los inventores compararon las intensidades del subconjunto de péptidos en las muestras que podrían identificarse mediante las búsquedas en la base de datos Mascot. La Fig. 3A (panel superior) muestra que los péptidos derivados de la uromodulina fueron significativamente más abundante en los pacientes de control que en los otros grupos (control frente al rechazo crónico activo mediado por anticuerpos (RACA), $p < 0,0001$). De los péptidos derivados del cininógeno, los de bradicinina (con dos estados de carga diferentes) fueron más abundantes en los pacientes de TRE y control que en los pacientes de DCA (Figura 3, panel central). El análisis de la expresión de péptidos específicos de uromodulina y cininas en pacientes individuales reveló que los péptidos uromodulina eran consistentemente más abundantes en los grupos control y de TRE que en los grupos de DCA (Figura 3B). Los iones de péptidos individuales que discriminaron mejor entre los grupos control y de DCA fueron los derivados de uromodulina a m/z 638 y de cininógeno a m/z 1003, lo que tiene como resultado la identificación correcta del 84 % (14/18) de los pacientes control y del grupo de DCA. El análisis de regresión logística tuvo como resultado la selección de los mismos iones. Una curva ROC construida a partir de las puntuaciones LR dio un valor del área bajo la curva (AUC) de 0,82.

Se alcanzó una mayor sensibilidad considerando la intensidad media de todos los péptidos derivados de uromodulina. De hecho, este valor podría identificar correctamente el 94 % (17/18) de los pacientes con DCA con un

100 % de especificidad (ninguno del grupo control tenía niveles bajos de péptidos de uromodulina, Fig. 3B). Por tanto, una combinación de biomarcadores tenía una potencia más discriminadora que cualquiera de los biomarcadores individuales que los inventores han identificado, y este hecho argumenta que el uso de la mezcla de los biomarcadores identificados aquí aumentaría la especificidad y la sensibilidad del diagnóstico de la DCA.

- 5 En estas muestras se pudo identificar otros péptidos, pero no proporcionaron información discriminadora. Como ejemplo, la Fig. 3A (panel inferior) muestra que los péptidos derivados de I κ B -microglobulina estaban presentes a aproximadamente las mismas cantidades en los grupos de muestras. Por tanto, los datos de los inventores indican que los péptidos derivados de uromodulina y bradicininas son biomarcadores específicos de un riñón sano, cuya presencia podría usarse para discriminar a los pacientes de DCA y los individuos no afectados.
- 10 Los péptidos tratados anteriormente, aunque útiles para el diagnóstico de DCA, no pudieron discriminar entre los grupos de RACA y de FIAT.

Listado de secuencias

<110> Colegio Oficial de Médicos de Barcelona

15 <120> Marcadores de aloinjerto de riñón sano

<130> 2008/0470

<160> 10

20

<170> Patentin versión 3,3

<210> 1

<211> 15

25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ile Asp Gln Ser Arg Val Leu Asn Leu Gly Pro Ile Thr Arg Lys

30

1 5 10 15

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

35

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Pro Met Val Ser Ala Leu Asn Ile Arg Val Gly Gly Thr Gly Met

40

1 5 10 15
Phe

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

45

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Gly Ser Val Ile Asp Gln Ser Arg Val Leu Asn Leu Gly Pro Ile

1 5 10 15

Thr Arg Lys

50

<210> 4

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 534 432 T3

<400> 4

Met Val Ser Ala Leu Asn Ile Arg Val Gly Gly Thr Gly Met Phe Thr
1 5 10 15

Val Arg Met Ala Leu Phe Gln Thr Pro Ser Tyr Thr Gln Pro Tyr
20 25 30

5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 5

Leu Asn Leu Gly Pro Ile Thr Arg Lys
1 5

15

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 6

Gly Ser Val Ile Asp Gln Ser Arg Val Leu Asn Leu Gly Pro Ile Thr
1 5 10 15

Arg

25

<210> 7
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 7

Ser Gly Ser Val Ile Asp Gln Ser Arg Val Leu Asn Leu Gly Pro Ile
1 5 10 15
Thr Arg

35

<210> 8
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

<400> 9

ES 2 534 432 T3

Asp Leu Ile Ala Thr Met Met Pro Pro Ile Ser Pro Ala Pro Ile Gln
1 5 10 15

Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln Ile
20 25

<210> 9
<211> 34
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Gln Val Val Ala Gly Lys Lys Tyr Phe Ile Asp Phe Val Ala Arg Glu
1 5 10 15

10 Thr Thr Cys Ser Lys Glu Ser Asn Glu Glu Leu Thr Glu Ser Cys Glu Thr Lys
20 25 30

<210> 10
<211> 10
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

20 Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Uso de péptido urinario aislado que consiste en las SEC ID N° 1 a la SEC ID N° 10 y combinaciones de los mismos como biomarcadores fisiológicos de función renal sana.
- 5 2. Uso de los péptidos urinarios aislados de la reivindicación 1 y combinaciones de los mismos, como biomarcadores en el control de la función renal de un aloinjerto renal.
3. Uso de los péptidos urinarios aislados de la reivindicación 1 y combinaciones de los mismos, en el pronóstico y / o diagnóstico de una nefropatía.
4. El uso de la reivindicación 3, cuando la nefropatía es nefropatía crónica del aloinjerto.
- 10 5. Un procedimiento para el control, pronóstico o diagnóstico de la fisiología renal que comprende
 - a) Obtener una muestra de un sujeto
 - b) Añadir un patrón interno para una cuantificación precisa.
 - c) Concentrar y desalar la muestra obtenida.
 - d) Analizar el contenido en péptidos mediante técnicas proteómicas.
 - 15 e) Cuantificar el contenido de los péptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, SEC ID N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 10 y combinaciones de los mismos.
 - f) Comparar los valores obtenidos en la etapa d) con valores control.
 - g) Aplicar los valores comparativos reunidos en la etapa e) en la evaluación o diagnóstico del funcionamiento fisiológico de un riñón
- 20 en el que una disminución en presencia de los péptidos es indicativa de una función renal no sana.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el sujeto es un paciente de la terapia de trasplante renal y el riñón es un riñón injertado.
7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que patrón interno es un péptido marcado isotópicamente con la misma secuencia que el péptido analito pero incorporando isótopos estables de carbono, nitrógeno e hidrógeno.
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la técnica proteómica comprende ESI-MS, DESI-MS, DIOS-MS, SELDI-MS, MALDI-MS, LC / MS, LC-MS / MS en tándem y cualquier otra técnica basada en la espectrometría de masas de alto rendimiento y / o técnicas basadas en anticuerpos, incluyendo ELISA, matrices de proteínas / péptidos, matrices de anticuerpos o combinaciones de los mismos.
- 30 9. Uso del procedimiento de la reivindicación 5 para controlar la eficacia terapéutica del tratamiento de un paciente de una patología renal.

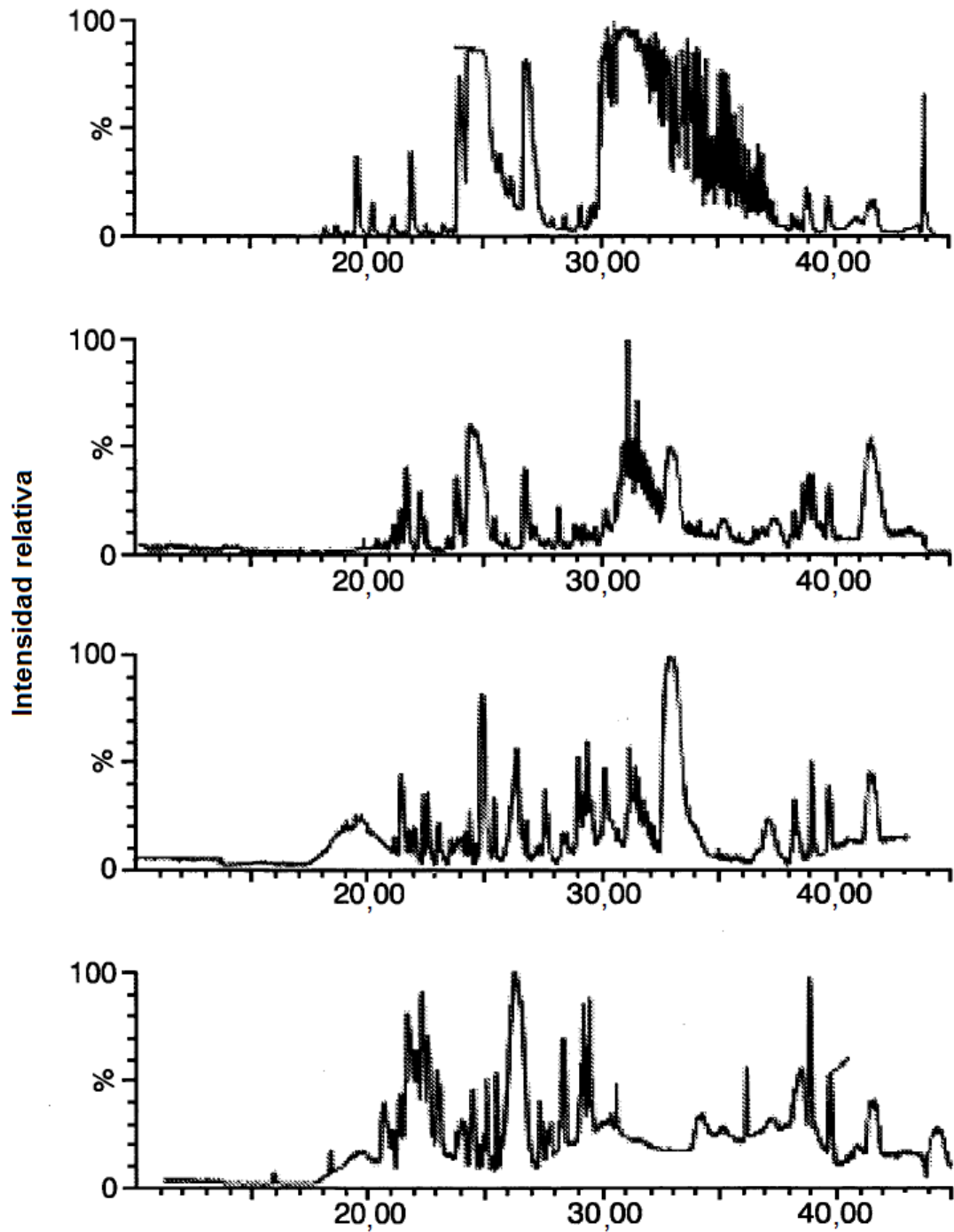


FIG. 1A

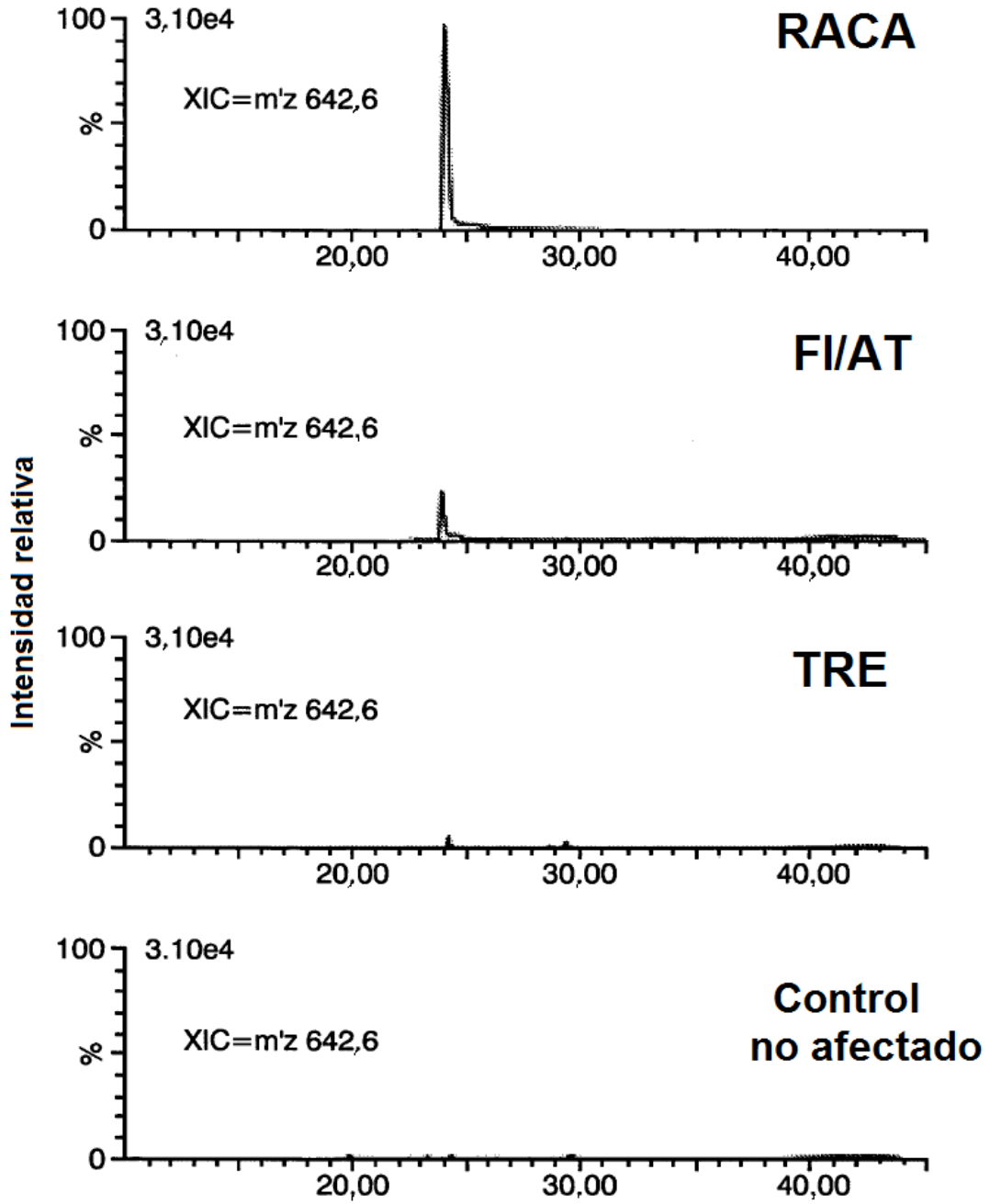


FIG. 1B

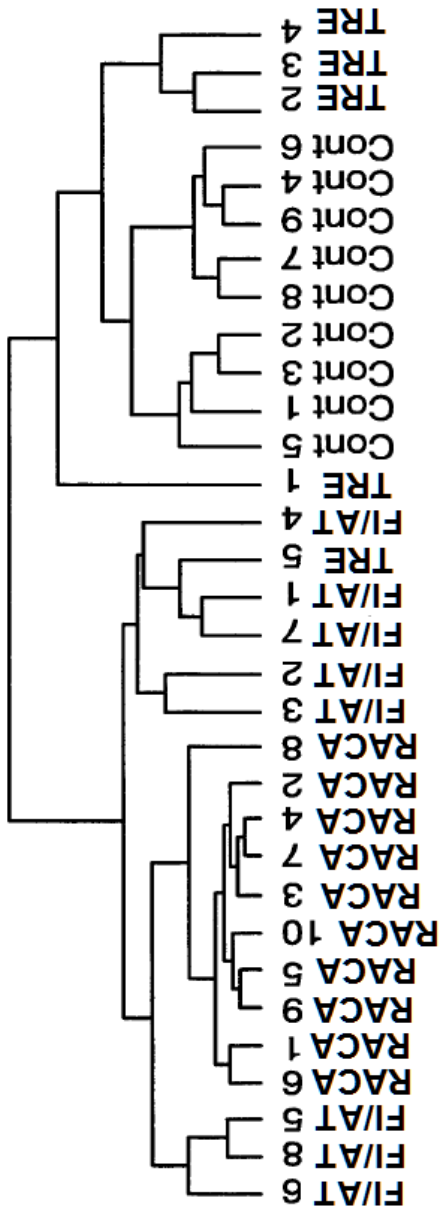


FIG. 2A

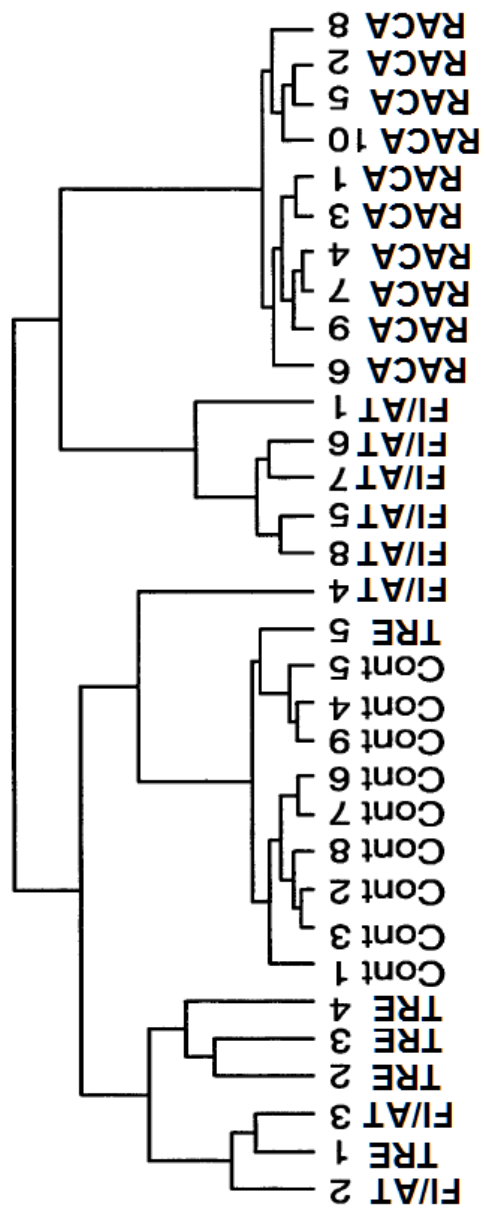


FIG. 2B

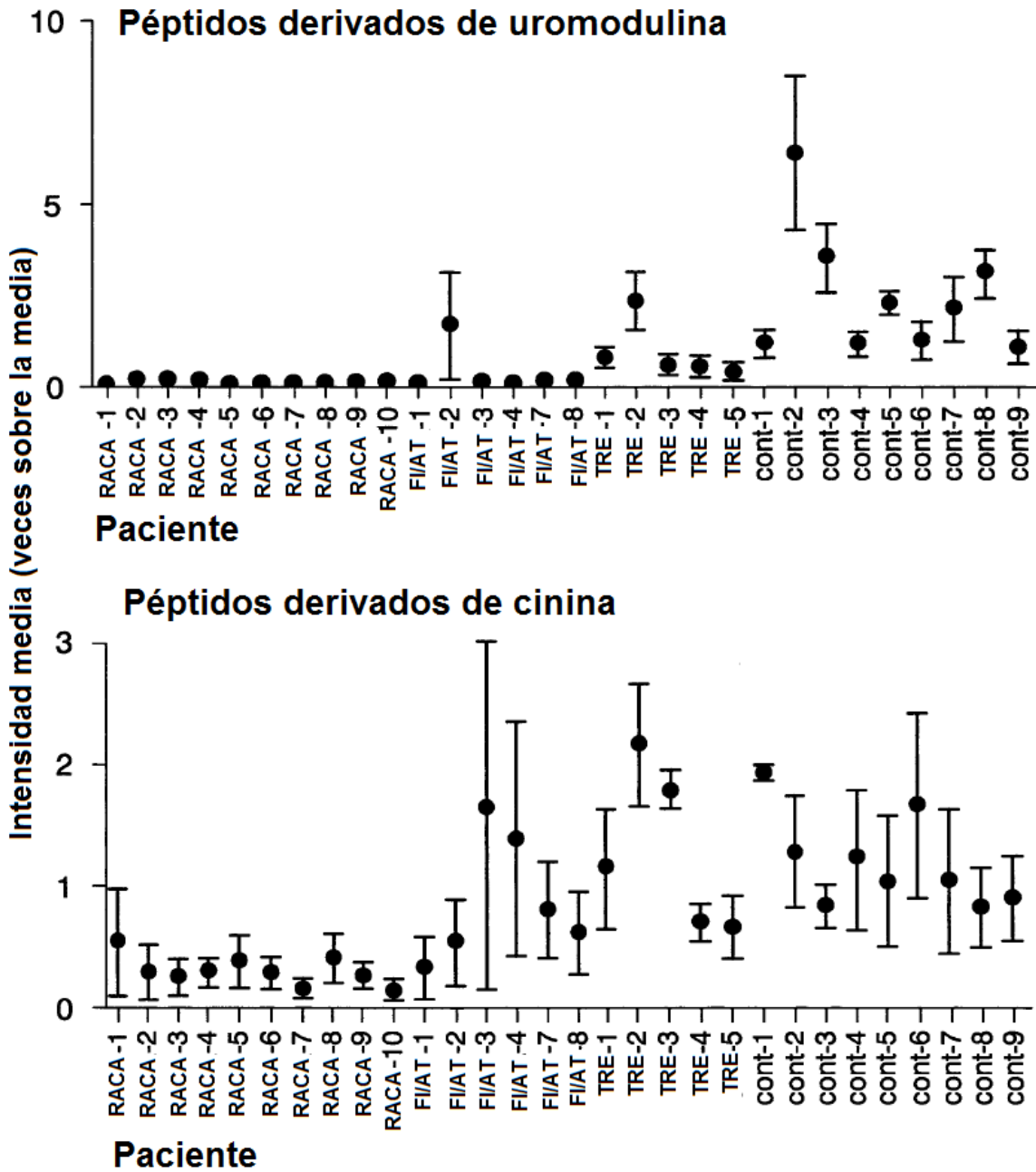


FIG. 3B