

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 818**

51 Int. Cl.:

C07K 14/16 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2011** **E 11305651 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016** **EP 2527361**

54 Título: **Biomarcadores para el pronóstico y diagnóstico in vitro de rechazo de injertos y trasplantes**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.06.2017

73 Titular/es:
BIOVIALIFE INC. (100.0%)
Unit 201
Toronto ON M5A 3W7, CA

72 Inventor/es:
AGBALIKA, FELIX

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 615 818 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 para el pronóstico y diagnóstico *in vitro* de rechazo de injertos y trasplantes

La presente invención se refiere a nuevos péptidos y a composiciones que los contienen para su uso como herramienta en el pronóstico o diagnóstico de una insuficiencia del órgano injertado, de manera destacable, del rechazo de injertos o trasplantes.

La función principal del riñón en organismos vivos es limpiar la sangre de productos de desecho o sustancias tóxicas. La lesión renal puede dañar la estructura renal (eliminación de células glomerulares o tubulares, fibrosis, y alteraciones de la vasculatura renal) que dan lugar a la disfunción excretora renal crónica (Lopez Novoa y col., J Transl Med 2011, 9: 13). La evolución de las enfermedades crónicas del riñón se puede controlar mediante eventos patológicos clave tales como el porcentaje de nefronas funcionalmente activas, la velocidad de filtración glomerular, la función renal excretora o mediante la medida de biomarcadores en plasma y orina (creatinina, ácido úrico, ...). La progresión de las enfermedades crónicas de riñón se ha clasificado en cinco estadios de acuerdo con la disfunción renal y el daño en el riñón (Levey y col., Ann Intern Med 2003, 139, 137-147). El estadio 1 es generalmente una fase silenciosa en la que la disfunción renal se puede revertir, mientras que los estadios terminales 4 y 5 se corresponden con fallo renal y la necesidad de una terapia de reemplazo renal, tal como diálisis o trasplante de riñón, cuando sea factible.

El trasplante de órganos también puede darse en otros órganos de otros sistemas, tales como el sistema circulatorio (corazón), el sistema digestivo (hígado) y el sistema respiratorio (pulmón). Los pacientes que padecen leucemia también pueden recibir injertos de tejidos blandos, es decir, injertos de médula ósea.

Cada año en Europa, se efectúan más de 15,000 injertos renales, 5,000 injertos hepáticos, 2,000 trasplantes de corazón y 1,000 injertos de pulmón. Normalmente, el trasplante de órganos es el único tratamiento para la insuficiencia terminal de un órgano. También se usan para trasplantes células y tejidos, tales como células madre hematopoyéticas o válvulas cardíacas para restaurar funciones esenciales. Con frecuencia, se producen acontecimientos y reacciones adversas en los receptores, tales como el rechazo de injertos o trasplantes. Esto puede producir como mínimo daños en el injerto y en última instancia, puede causar su pérdida. El uso de fármacos inmunosupresores ayuda a mejorar los resultados del trasplante al modular las reacciones inmunes de los receptores. Sin embargo, estos fármacos inducen un conjunto de acontecimientos adversos para los pacientes que limitan su calidad de vida o su esperanza de vida. Los efectos secundarios más frecuentes son nefrotoxicidad, cáncer y eventos cardiovasculares.

Se han identificado mecanismos moleculares subyacentes al rechazo de injertos o trasplantes. El rechazo inmune está mediado por la activación de los linfocitos T del receptor contra las células del donante. Los linfocitos T del receptor reconocen los antígenos codificados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I del donante. La infiltración del órgano trasplantado por células T y otros leucocitos mononucleares (tales como linfocitos B y linfocitos citotóxicos naturales) es la responsable del daño al injerto, al activar el sistema de complemento y las células mononucleares. Los linfocitos T tanto CD4+ CD8+ participan en el rechazo celular agudo. La producción de anticuerpos anti-MHC de clase I y de clase II del donante se asocia también con el daño agudo y crónico del injerto. En el rechazo crónico del injerto, la activación de la respuesta inmune del receptor no es probablemente la única causa del rechazo. Las causas adicionales tales como fibrosis, infección vírica o recurrencia de la enfermedad original podrían jugar un importante papel en el rechazo del injerto (Sanchez-Fueyo y col., Gastroenterology 2011, 140, 51-64).

Los episodios de rechazo se diagnostican mediante parámetros clínicos convencionales, que son específicos para el órgano injertado y dependen de factores genéticos, y se confirman en su mayoría mediante biopsia. En la actualidad, la biopsia de un tejido de aloinjerto con un examen histológico convencional sigue siendo el patrón de oro para el diagnóstico de rechazo entre los pacientes trasplantados (Racusen y col., The Banff 97 working classification of renal allograft pathology, Kidney International 1999, 55, 713-723). Como los protocolos de biopsia son procedimientos invasivos, se necesita la intervención del médico para recoger un pequeño trozo de tejido del órgano injertado. Aunque estas pruebas predicen con bastante precisión el fallo del injerto, por lo general lo detectan en un estadio relativamente avanzado, cuando ya se ha producido un daño extenso en los tejidos. La detección temprana del fallo del injerto antes de que se produzca el daño en los tejidos puede ayudar a los médicos a controlar los fármacos inmunosupresores con mayor eficacia, minimizando sus efectos secundarios a la vez que se prolongan las tasas de supervivencia del injerto. La identificación de proteínas en sueros indica qué pacientes están en mayor riesgo de un rechazo agudo del aloinjerto y la disfunción crónica del aloinjerto puede ser útil en el desarrollo de nuevos ensayos de pronóstico y diagnóstico *in vitro* aplicables a una muestra de fluido corporal.

La identificación de biomarcadores para el rechazo de injertos y trasplantes sigue siendo un reto. En los últimos diez años, se han desarrollado diferentes estrategias para identificar dichos marcadores. La primera estrategia consiste en seleccionar una proteína específica por su implicación conocida en la reacción del sistema inmune. El documento US 2008/274910 desvela que un perfil de expresión mejorado de TIRC-7 (respuesta inmunitaria de linfocitos T a ADNc 7) en sangre de pacientes con injerto renal es determinante para la activación temprana de la activación inmunitaria que podría conducir al rechazo del injerto.

Se han identificado más proteínas ubicuas (no involucradas en el sistema inmune) tales como TRIB-1, un activador de MAP cinasa (documento WO 20071138011), o lisozimas (documento JP 2006/6177679) como marcadores para diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* del rechazo agudo de injerto renal o entérico. En todos los ejemplos previos, se utilizó una sola proteína.

5 Otra estrategia fue estudiar el perfil transcripcional de un órgano trasplantado. En el documento WO 2004/074815, los inventores estudiaron la expresión de genes conocidos que codifican proteínas pro-inflamatorias o de adhesión que median la activación inmune y las proteínas anti-apoptóticas en el tejido renal trasplantado en 15 minutos tras la reperfusión vascular. Los resultados demuestran que el retraso en la función del injerto, el rechazo agudo o el rechazo retardado pueden predecirse a partir de la expresión diferencial de agrupaciones de genes junto con información clínica.

Recientemente, se ha desarrollado una estrategia más global en el campo del rechazo de injertos. Las tecnologías genómicas o proteómicas han posibilitado la elaboración de perfiles de expresión génica o de proteínas en muchas enfermedades humanas.

15 Las herramientas de micromatrices ofrecen la posibilidad de detectar patrones de genes expresados diferencialmente entre cientos o miles de genes. En el documento WO 2010/083121, los inventores exploraron en plataformas de micromatrices el nivel de expresión del genoma completo en una muestra de sangre de un paciente que ha recibido un injerto de riñón e identificaron un conjunto de genes cuyo nivel de expresión se confirmó mediante la tecnología de RT-PCR. El perfil de expresión génica se emplea para predecir la aparición de una respuesta de rechazo agudo con entre 6 a 3 meses de antelación. Se desarrolló una estrategia similar mediante el uso de datos obtenidos por ordenador de estudios de micromatrices de expresión génica basados en biopsias de trasplantes renales y cardíacos (Chen y col., PLoS Computational Biology 2010, 6(9), 1-12). Esto condujo a la identificación de los tres biomarcadores de proteínas de rechazo agudo cruzado, es decir, PECAM-1, CXCL-9 y CD44.

25 En trasplantes de corazón, los estudios de observación de la expresión génica del rechazo de aloinjerto cardíaco (CARGO, por sus siglas en inglés) condujeron al desarrollo de una prueba no invasiva, homologada por la Administración de Fármacos y Alimentos, disponible en el mercado para el rechazo agudo (www.allomap.com). Los niveles de expresión medidos de 20 genes se transforman mediante un algoritmo en un valor entero que se comunica a una puntuación. El médico utiliza esta puntuación en la evaluación general de la probabilidad de rechazo en el momento de la prueba. Este ensayo de diagnóstico *in vitro* puede realizarse entre 2 hasta 6 meses tras el trasplante para evaluar el rechazo.

35 La medición de la concentración plasmática de proteínas mediante el uso de la metodología iTRAQ-MALDI-TOF/TOF identificó 18 códigos de grupos de proteínas con una concentración relativa diferencial (Cohen Freue y col., Molecular & Cellular Proteomics 9.9 2010, 1954-1967). Algunas de estas proteínas se han asociado previamente con el rechazo agudo de injerto renal tales como aquellas involucradas en el sistema del complemento (MBL2, proteína C de unión a manosa), la cascada de coagulación (SERPINA10 y Factor 11) o la respuesta inflamatoria (proteína estimuladora de macrófagos-MSPT-1 y MSPT-9). En esta publicación, los autores también desvelan una proteína anti-hipertrófica secretada por los cardiomiocitos llamada PI16, y un miembro de unión a la vitamina E de la proteína de la familia de la albúmina llamada AFM, teniendo dichas proteínas un papel desconocido en la función renal. Este estudio refuerza la idea de que es posible identificar biomarcadores universalmente presentes en todos los órganos trasplantados.

45 La identificación de nuevas proteínas con un papel desconocido en el rechazo agudo o crónico puede proporcionar no solo nuevos ensayos para el pronóstico o diagnóstico del rechazo de órganos, sino también nuevas dianas para la intervención terapéutica. De este modo, esto podría conducir a la retirada total o parcial de fármacos inmunosupresores o a adaptar el régimen o a cambiar el principio activo usado para permitir la tolerancia del injerto en el receptor.

50 Aunque las tecnologías genómicas y proteómicas mencionadas anteriormente constituyen herramientas poderosas que conducen a la identificación de nuevos genes o proteínas como marcadores del rechazo agudo o crónico de injertos, su aplicación sigue siendo costosa y no siempre están disponibles en un hospital. Por consiguiente, sigue habiendo necesidad de marcadores alternativos que posibiliten ensayos sencillos, rápidos y fáciles de aplicar en el pronóstico y diagnóstico del rechazo de injertos y trasplantes.

Por lo tanto, uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar nuevas proteínas que sean biomarcadores específicos de insuficiencias en el órgano injertado, de manera destacable, del rechazo de injertos y trasplantes.

55 La presente invención permite no solo el diagnóstico, sino también el pronóstico del rechazo de injertos y trasplantes en solo unos pocos minutos.

La presente invención se refiere a un péptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1. La presente descripción también describe péptidos derivados de la SEQ ID NO: 1, teniendo dicho péptido al menos un 65 % de identidad con los aminoácidos 1 a 11 de la SEQ ID NO: 1, con la condición de que el

péptido no sea una proteína vírica nativa.

Por "proteína vírica nativa" se entiende una secuencia proteica que comprende, se corresponde con, está presente en o se deriva de otra manera de cualquier secuencia proteica que pueda encontrarse en el genoma de un virus. Como ejemplo de proteína vírica nativa, se cita la proteína gag del VIH.

- 5 En una realización preferida, el péptido de acuerdo con la invención tiene al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 75%, más preferentemente al menos un 80%, más preferentemente al menos un 85%, más preferentemente al menos un 90 % y lo más preferentemente al menos un 95 % de identidad con los aminoácidos 1 a 11 de la SEQ ID NO: 1.

- 10 Por el término "péptido" se entiende una cadena lineal de aminoácidos contigua. Esta cadena de aminoácidos contigua puede ser de origen tanto natural como artificial (procedente de síntesis química). Los procedimientos de síntesis química de péptidos son bien conocidos para un experto en la materia.

- 15 Los fragmentos de péptidos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 también son parte de la presente descripción. Por fragmento de péptido se entiende una cadena de al menos 5 aminoácidos contiguos seleccionada entre los once aminoácidos del péptido de la SEQ ID NO: 1 que son capaces de unirse a anticuerpos producidos contra el péptido de la SEQ ID NO: 1.

- 20 También son parte de la presente descripción las variantes del péptido de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, que pueden obtenerse mediante alteraciones de la secuencia de dicho péptido. Estas alteraciones pueden incluir sustituciones, deleciones, inserciones o mutaciones. También pueden incluirse en dichas variantes aminoácidos modificados o inusuales. Los grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de restos de aminoácidos en los grupos N o C terminales también pueden modificarse de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica. Dichos derivados incluyen, por ejemplo, ésteres, amidas alifáticas de los grupos carboxilo y derivados N-acilo de los grupos amino libres. Además, los aminoácidos pueden someterse a modificaciones post-traduccionales tales como glicosilación, sialilación, acetilación, metilación, amidación, sulfatación, formilación o fosforilación.

- 25 Los péptidos y las variantes del péptido que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 que pueden ser sales de péptidos también son parte de la presente descripción. La sal del grupo carboxilo comprende sales inorgánicas como por ejemplo, sales de sodio, potasio y calcio con bases inorgánicas, tales como trietanolamina, arginina o lisina. La sal del grupo amino comprende, por ejemplo, sales con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico o con ácidos orgánicos, tales como ácido acético.

- 30 El péptido de la SEQ ID NO: 1 se ha denominado VEA195.

El péptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 procede de una proteína del suero con un peso molecular de 25-30 kDa, aislada de un hospedador injertado o trasplantado.

- 35 La presente invención se refiere también a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un péptido como se ha definido anteriormente, en particular, una secuencia de ácido nucleico capaz de codificar un péptido que comprende o contiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, en la que dicho ácido nucleico es la SEQ ID NO: 2 con la condición de que la molécula de ácido nucleico no sea un ácido nucleico vírico nativo.

- 40 La presente divulgación describe también una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un péptido como se ha definido anteriormente, en particular, una secuencia de ácido nucleico capaz de codificar un péptido que comprende o contiene el péptido derivado de la SEQ ID NO: 1 con la condición de que el péptido no sea un péptido vírico nativo, en la que dicho ácido nucleico es un fragmento de la SEQ ID NO: 2, con la condición de que la molécula de ácido nucleico no sea un ácido nucleico vírico nativo.

Por "ácido nucleico vírico nativo" se entiende una secuencia de ácido nucleico que comprende, se corresponde con, está presente en o procede de otra manera de cualquier secuencia de ácido nucleico que pueda encontrarse en el genoma de un virus. A modo de ejemplo de la secuencia de ácido nucleico nativa, puede citarse el gen *gag* del VIH.

- 45 Debido a la degeneración del código genético, los codones que codifican los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 pueden diferir en cualquiera de sus tres posiciones. Por ejemplo, el aminoácido lisina puede especificarse mediante los codones AAA o AAG (diferencia en la tercera posición).

- 50 Por la expresión "molécula de ácido nucleico" se entiende una molécula de ADN mono o bicatenaria, o una molécula de ARN mono o bicatenaria, deduciéndose dicha molécula de ARN directamente a partir de la molécula de ADN, o una molécula híbrida de ADN/ARN, que codifica el péptido de la presente invención.

La presente invención se refiere también a una construcción de ácido nucleico recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico anteriormente mencionada unida de manera operable a un vector de expresión.

Por la expresión "unido operablemente" se entiende que la molécula de ácido nucleico anteriormente mencionada está unida de manera covalente a un vector de expresión, permitiendo al ribosoma traducir la molécula de ácido

nucleico, o permitiendo que la ARN polimerasa produzca un ARNm que codifica el péptido de acuerdo con la invención.

5 Por la expresión "vector de expresión" se entiende una molécula hecha de ácidos nucleicos, en particular un plásmido, que comprende una región promotora y, opcionalmente, una región potenciadora. El vector de expresión puede incluir otros genes, tales como un gen de resistencia a antibióticos, con el fin de seleccionar células hospedadoras que contienen la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido de acuerdo con la invención. Las técnicas de producción recombinantes que utilizan el vector de expresión antes mencionado son bien conocidas por los expertos en la materia.

10 La presente invención también se refiere a una célula hospedadora que comprende la construcción de ácido nucleico recombinante anteriormente mencionada.

Por el término "célula hospedadora" se entiende cualquier célula viva, en particular eucariota, pero también células bacterianas, o cualquier medio no vivo que comprenda maquinaria transcripcional y/o de traducción y opcionalmente orgánulos de una célula, permitiendo amplificar la construcción de ácido nucleico anteriormente mencionada y/o producir el péptido de acuerdo con la invención.

15 La presente invención también se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un epítipo, conteniendo o consistiendo dicho epítipo en la secuencia de la SEQ ID NO: 1. La presente descripción también describe un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a un epítipo, comprendiendo o consistiendo dicho epítipo en fragmentos del péptido de la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

20 Por el término "anticuerpo" se entiende un anticuerpo que pertenece a cualquier especie, tal como de especie humana, de ratón, rata, conejo o cabra. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo quimérico, es decir, un anticuerpo que comprende partes cuyo origen es de especies diferentes. El anticuerpo también puede ser humanizado. El anticuerpo también puede ser un fragmento de anticuerpo que contiene al menos un parátipo, tal como los fragmentos Fab, F(ab')₂ o scFv. El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. El anticuerpo monoclonal también puede ser un anticuerpo monoclonal anti-idiotípico o un fragmento Fab de un anticuerpo anti-idiotípico. El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo natural o un anticuerpo recombinante.

25 Por el término "específicamente" se entiende que el péptido interactúa con un anticuerpo sin interactuar sustancialmente con otro anticuerpo que no se asemeje estructuralmente al anticuerpo anteriormente mencionado.

30 Los procedimientos para generar anticuerpos policlonales o monoclonales son de sobra conocidos por los expertos en la materia. Típicamente, el péptido de la SEQ ID NO: 1 puede inyectarse con una proteína transportadora de alto peso molecular a mamíferos no humanos (ratón, conejo, cabra u oveja, por ejemplo) con el fin de provocar una buena respuesta inmune. El protocolo de inmunización puede realizarse varias veces antes de sacrificar al animal. Después, se purifica el suero del animal en una columna de cromatografía para aislar el anticuerpo monoclonal o policlonal de interés.

35 Típicamente, el anticuerpo monoclonal resulta de la selección de un hibridoma que secreta un anticuerpo generado contra el péptido de la SEQ ID NO: 1. Dicho hibridoma resulta de la fusión entre células esplénicas de mamífero no humano inmunizado con el péptido de la SEQ ID NO: 1 y células de mieloma de mamíferos no humanos. La selección de hibridomas ocurre basándose en su capacidad para secretar anticuerpos capaces de unirse al péptido de la SEQ ID NO: 1.

40 En una realización preferida, los anticuerpos que se dirigen a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 se secretan por los hibridomas depositados en la CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia) bajo el Tratado de Budapest el 4 de mayo de 2011, con los números de referencia CNCMI-4479, CNCM I-4480 y CNCM I-4481 que son parte de la presente invención.

45 La presente divulgación también describe que los anticuerpos que se dirigen a un péptido derivado de la SEQ ID NO: 1 se secretan por los hibridomas depositados en la CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia) bajo el Tratado de Budapest el 4 de mayo de 2011, con los números de referencia CNCM I-4479, CNCM I-4480 y CNCM I-4481.

50 La presente invención también se refiere a los hibridomas 2C7D10E5, 4H7A7G9 y 1H8C9C10C7 depositados en la CNCM el 4 de mayo de 2011 con los números de referencia CNCM I-4479, CNCM I-4480 y CNCM I-4481, respectivamente.

55 La presente invención también se refiere a los hibridomas depositados en la CNCM (París) bajo el Tratado de Budapest el 4 de mayo de 2011, con los números de referencia CNCM I-4479, CNCM I-4480 o CNCM I-4481, que secretan un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un epítipo que consiste en el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

El péptido de acuerdo con la presente invención es inmunogénico, es decir, el péptido VEA195 es capaz de inducir una respuesta inmune humoral una vez inyectado en un mamífero. Aún se desconoce la función exacta de la proteína completa a partir de la cual se ha identificado el péptido VEA195 en el rechazo de injertos. Como nadie puede predecir si esta proteína tiene un efecto beneficioso o perjudicial en el rechazo de injertos, podrían desarrollarse dos estrategias terapéuticas para evitar el rechazo de injertos. Si la presencia de esta proteína es necesaria, podría ser útil administrar al receptor una o más dosis de vacuna de ADN antes o en el momento de efectuar el injerto con un plásmido que comprende un polinucleótido que codifica la proteína del receptor de la que se derivó el péptido VEA195. Esta estrategia se ensayó en el documento WO 2009/114735 utilizando la vacuna de ADN que consiste en un plásmido que comprende un polinucleótido que codifica la proteína pro-apoptótica Bax. Al contrario, si la ausencia de esta proteína es necesaria, puede efectuarse la eliminación de la proteína completa de la que procede el péptido VEA195 mediante el uso de anticuerpos de inmovilización generados específicamente contra dicho péptido VEA195. Un experto habitual en la técnica podría utilizar un procedimiento en el que se extrae sangre de la circulación del paciente para aplicarle un procedimiento de eliminación a la misma antes de que devuelva a la circulación. Por ejemplo, los anticuerpos producidos contra el péptido VEA195 pueden unirse a una columna de resina de un aparato que hace circular la sangre fuera del cuerpo. La proteína de 25-30 kDa a partir de la que se ha identificado el péptido VEA195 puede retenerse en la columna mientras que la sangre completa se devuelve al cuerpo del paciente injertado. La rápida eliminación de esta proteína de la circulación sanguínea podría limitar el rechazo del injerto o trasplante.

La presente invención también se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un epítipo que consiste en el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y que se secreta por uno de los hibridomas con los números de referencia CNCM I-4479, CNCM I-4480 y CNCM I-448, como se definieron anteriormente.

Otro objetivo de la invención es proporcionar una composición que comprende al menos un péptido o un anticuerpo, tal como se ha definido anteriormente.

La presente invención también se refiere a una composición que comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo que consiste en el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o que se secreta por uno de los hibridomas con número de referencia CNCM I-4479, CNCM I-4480 y CNCM I-448, como se definieron anteriormente.

Otro objetivo más de la invención es proporcionar una composición como se ha definido anteriormente, para su uso como una herramienta pronóstica, diagnóstica o de control para evaluar insuficiencias en un órgano injertado, de manera destacable, del rechazo de injertos o trasplantes.

Los términos "pronóstico" y "diagnóstico" se refieren, respectivamente, a determinar si se va a producir o si se está produciendo el rechazo de un injerto o trasplante en un mamífero.

Por la expresión "insuficiencia en el órgano injertado" se entiende una disfunción del órgano injertado o al fallo en un órgano injertado. La pérdida de la función del órgano puede ser el resultado, pero sin limitación, de la acumulación de sustancias normalmente eliminadas por el órgano o de la incapacidad del órgano para realizar su función fisiológica anabólica o catabólica. El fallo orgánico puede relacionarse con, pero sin limitación, necrosis, fibrosis o procesos inflamatorios.

Por ejemplo, la insuficiencia renal puede asociarse con varios daños en el riñón injertado, tales como necrosis tubular aguda (ATN), necrosis tubular intersticial crónica (CITN), enfermedad linfoproliferativa post-trasplante (PTLD), glomerulonecrosis extracapilar o rechazo del injerto, que es el grado más alto de insuficiencia renal.

La insuficiencia del órgano injertado no se restringe al riñón injertado, sino que también puede producirse en otros órganos y tejidos injertados o trasplantados, tales como el pulmón, el corazón, el hígado y la médula ósea.

Por el término "injerto" se entiende la introducción de células o tejido en el cuerpo de un mamífero receptor que procede de otro individuo de la misma especie (aloinjerto) o de una especie diferente (xenoinjerto) para restaurar una función alterada por una enfermedad o un daño. Las células hematopoyéticas, las células sanguíneas del cordón umbilical, y las células pancreáticas beta ilustran los injertos celulares que se realizan con más frecuencia. Los injertos de piel, de médula ósea, de parte del hígado o de córnea se proporcionan como ejemplos de injerto de tejido.

Por el término "trasplante" se entiende la introducción de un órgano extirpado del cuerpo de un mamífero donante en el cuerpo de un mamífero receptor cuyo órgano ya no pueda efectuar correctamente su función. Cuando el donante de órgano y el receptor del órgano son de la misma especie se denomina alotrasplante. El xenotrasplante se produce cuando el donante del órgano y el receptor del órgano son de dos especies diferentes. Los órganos trasplantados con más frecuencia en los mamíferos son el pulmón, el riñón, el corazón, el hígado, el páncreas y el intestino. Todos los tipos de injerto o trasplante anteriormente mencionados se proporcionan para ilustrar el campo de la invención, pero no deben usarse para limitar el ámbito de la presente invención.

Por la expresión "rechazo de injerto o trasplante" se entiende que se produce se produce la destrucción total o

parcial de las células, tejido u órgano injertado por parte del sistema inmunitario del receptor. Se han identificado tres tipos de rechazo de órganos: hiperagudo, agudo y crónico. El rechazo hiperagudo se produce generalmente en las primeras veinticuatro horas después del trasplante. El rechazo agudo se produce en los primeros seis meses del trasplante, mientras que el rechazo crónico podría producirse a partir de los seis meses hasta varios años después del trasplante, a pesar del uso de fármacos inmunosupresores.

5 La presente invención también proporciona un procedimiento para predecir o efectuar el pronóstico o diagnóstico *in vitro* de una insuficiencia del órgano injertado, de manera destacable, el rechazo de un injerto o trasplante en un mamífero, que comprende las siguientes etapas:

(i) determinar la presencia o la cantidad de péptido de la SEQ ID NO: 1,

10 en una muestra biológica de dicho mamífero.

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para predecir o efectuar el pronóstico o diagnóstico *in vitro* de una insuficiencia del órgano injertado, de manera destacable, el rechazo de un injerto o trasplante en un mamífero, que comprende las siguientes etapas:

(i) determinar la presencia o cantidad de anticuerpos producidos contra el péptido de la SEQ ID NO: 1,

15 en una muestra biológica de dicho mamífero.

La presente divulgación describe también un procedimiento para predecir o realizar el pronóstico o diagnóstico *in vitro* de una insuficiencia de un órgano injertado, de manera destacable, el rechazo de un injerto o trasplante en un mamífero, que comprende las siguientes etapas:

(i) determinar la presencia o cantidad de fragmentos del péptido de la SEQ ID NO: 1,

20 en una muestra biológica de dicho mamífero.

En otra realización, la presente divulgación también describe un procedimiento para predecir o realizar el pronóstico o diagnóstico *in vitro* de una insuficiencia de un órgano, de manera destacable, el rechazo de un injerto o trasplante en un mamífero, que comprende las siguientes etapas:

(i) determinar la presencia o cantidad de anticuerpos generados contra fragmentos del péptido de la SEQ ID NO: 1,

25 en una muestra biológica de dicho mamífero.

El término "mamífero" incluye seres humanos, así como otros mamíferos, tales como, por ejemplo, cerdos, vacas, caballos, conejos, gatos, y perros. El mamífero puede ser femenino o masculino, un adulto o un niño.

30 De acuerdo con la invención, la detección o determinación del nivel de péptido de SEQ ID NO: 1, o de anticuerpos generados contra el péptido de la SEQ ID NO: 1 puede realizarse mediante cualquier técnica conocida en la materia y preferentemente mediante el uso de un procedimiento de inmunoensayo.

De acuerdo con la presente divulgación, la detección o determinación del nivel de fragmentos del péptido de la SEQ ID NO: 1, o de anticuerpos generados contra fragmentos del péptido de la SEQ ID NO: 1 puede realizarse mediante cualquier técnica conocida en la materia y preferentemente mediante el uso de un procedimiento de inmunoensayo.

35 Por el término "inmunoensayo" se entiende cualquier procedimiento en el que se determine el nivel de péptido de la SEQ ID NO: 1 o de anticuerpo generado específicamente contra el péptido de la SEQ ID NO: 1 usando al menos un péptido y/o un anticuerpo como se ha definido anteriormente en la memoria descriptiva. Los procedimientos de inmunoensayo son de sobra conocidos por un experto habitual en la materia y pueden tener diversos formatos, por ejemplo, en fase sólida o líquida, en una o dos etapas, mediante un procedimiento en sándwich o competitivo.

40 A modo de ejemplo, se puede usar el ensayo de inmunocromatografía con oro coloidal (CIA) (Cao y col., Am. J. Trop. Med. Hyg. 2007, 76(3), 553-558). Este tipo de inmunoensayo es particularmente sencillo de implementar y se obtienen resultados cualitativos en menos de 30 minutos, y preferentemente en menos de 20 minutos y más preferentemente en 10 minutos.

45 Puede revelarse la presencia del antígeno en la muestra biológica mediante un anticuerpo de detección marcado con oro coloidal, siendo dicho anticuerpo capaz de unirse al péptido o proteína de interés, reconociendo una zona epitópica que es diferente de la reconocida por el anticuerpo de captura. Preferentemente, el anticuerpo de captura se une a un soporte sólido, en particular, a una membrana de acetato de celulosa, y el anticuerpo marcado con oro coloidal se considera el anticuerpo migratorio.

50 En cuanto a otros ejemplos, se pueden usar ensayos ELISA, radio-inmunoensayos o cualquier otro procedimiento de detección para revelar la presencia de complejos antígeno-anticuerpo formados. Por lo tanto, se debe considerar

diferentes tipos de marcado de ligandos y/o anticuerpos (radiactivos, enzimáticos, fluorescentes, ...).

5 La determinación de la medida del péptido de la SEQ ID NO: 1 o del anticuerpo producido específicamente contra el péptido de la SEQ ID NO: 1 se efectúa en una muestra biológica de un receptor injertado o trasplantado unas pocas horas o días después de que se haya producido el injerto o el trasplante. La muestra biológica puede ser una muestra de fluido corporal o una muestra sólida, tal como una biopsia del órgano o tejido injertado.

Por la expresión "muestra de fluido corporal" se entiende cualquier tipo de muestra adecuada para su uso en los procedimientos de acuerdo con la invención. La muestra biológica puede seleccionarse entre el grupo formado por una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de orina o una muestra de saliva.

10 La presente invención también se refiere a un kit para el pronóstico o diagnóstico *in vitro* de la insuficiencia de un órgano injertado, de manera destacable, del rechazo de injertos y trasplantes que comprende:

- (i) al menos un anticuerpo adecuado para su unión a un epítipo que comprende o consiste en un péptido de la SEQ ID NO: 1,
- (ii) al menos un anticuerpo acoplado a un sistema de detección adecuado para su unión al complejo antígeno-anticuerpo,

y opcionalmente al menos un péptido de la SEQ ID NO: 1.

La presente divulgación también describe un kit para el pronóstico o diagnóstico *in vitro* de la insuficiencia de un órgano injertado, de manera destacable, del rechazo de injertos y trasplantes que comprende:

- (i) al menos un anticuerpo adecuado para la unión a un epítipo que comprende o consiste en fragmentos del péptido de la SEQ ID NO: 1,
- (ii) al menos un anticuerpo acoplado a un sistema de detección adecuado para su unión al complejo antígeno-anticuerpo,

y opcionalmente al menos un fragmento de péptido de la SEQ ID NO: 1.

25 La presente invención también se refiere a un kit para el pronóstico o diagnóstico *in vitro* de una insuficiencia de un órgano injertado, de manera destacable, del rechazo de injertos y trasplantes que comprende:

- (i) un anticuerpo, que se une específicamente a un epítipo que consiste en el péptido de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o que se secreta por uno de los hibridomas con los números de referencia CNM I-4479, CNM I-4480 y CNM I-448, como se definieron anteriormente, adecuado para unirse a un epítipo que consiste en un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1,
- (ii) un anticuerpo acoplado a un sistema de detección adecuado para su unión al complejo antígeno-anticuerpo, y opcionalmente un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

La presente invención también se refiere al uso del péptido de la SEQ ID NO: 1 o de fragmentos de dicho péptido como marcador para el pronóstico o diagnóstico *in vitro* de una insuficiencia del órgano injertado, de manera destacable, del rechazo de injertos o trasplantes en un mamífero.

35 La presente invención también se refiere al uso de una molécula de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2 capaz de codificar un péptido de la SEQ ID NO: 1 como marcador para el pronóstico o diagnóstico *in vitro* de una insuficiencia de un órgano injertado, de manera destacable, del rechazo de injertos o trasplantes en un mamífero.

40 Por el término "marcador" también se entiende "biomarcador", que se refiere a cualquier proteína y/o molécula de ácido nucleico cuya modulación de la expresión es útil para el pronóstico o diagnóstico de un rechazo de injerto o trasplante.

Los siguientes ejemplos 1 a 4 y las figuras 1 a 2 ilustran la invención.

La figura 1 presenta la localización tisular de la proteína a partir de la cual se ha aislado VEA195. Se efectuaron biopsias renales en receptores que padecían o no rechazo de trasplante de acuerdo con el ejemplo 2:

- A - Paciente injertado que no padece rechazo
- B - Paciente injertado que padece rechazo

La figura 2 presenta los resultados de un ensayo de inmunocromatografía con oro coloidal (CIA). Tiras para el diagnóstico de la proteína completa a partir de la cual deriva el péptido VEA195 en el suero de un receptor de órgano de acuerdo con el ejemplo 3:

- (a) - Paciente injertado que no padece rechazo
- (b) - Paciente injertado que padece rechazo

Ejemplo 1: Aislamiento, extracción, purificación de la proteína de 25-30 kDa y síntesis del péptido VEA195 correspondiente al péptido inmunogénico endógeno identificado en la proteína de 25-30 kDa.

1.1- Protocolo

5 Se recogieron cinco muestras de suero de pacientes con injertos renales y se limpiaron de inmunoglobulina humana (IgG) mediante un flujo rápido de proteína G sefarosa 4 (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Se obtuvo un volumen total de 15 ml y se cargó en una columna cromatográfica Sephadex G-75 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) para la separación mediante el uso de tampón de cloroformo metanol 3/1. Se recogieron eluatos de fracciones de 200 µl y el análisis de las fracciones n.º 4-5 (400 µl) mostró la presencia de la proteína de 25-30 kDa.

10 después, se sometieron los 400 µl a un protocolo de diálisis en tubos (Sigma-Aldrich, Francia) mediante inmersión en 4 l de PBS durante una noche a 4 °C. Se recogió un volumen final de 200 µl de dializado y permitió la identificación de una pequeña secuencia de 1,2 kDa que tiene propiedades inmunogénicas. La secuenciación de esta fracción se ha definido como VEA195. Se ha sintetizado este péptido.

15 Se ensambló el péptido VEA195 en un sintetizador automático mediante un procedimiento de sobra conocido por un experto en la materia. Brevemente, la síntesis de péptidos en fase sólida se desarrolló utilizando la estrategia de Boc/bencilo. Cada aminoácido se acopló con un exceso de cinco veces, cada acoplamiento se realizó en DMF, en presencia de PyBPO, HOBT y DIEA. El péptido se ancló a la resina mediante tratamiento con fluoruro de hidrógeno y se purificó mediante cromatografía de fase inversa. Las fracciones con pureza superior al 95 % se agruparon.

1.2 - Resultados

20 Se controló la identidad del péptido VEA195 mediante espectrometría de masas analítica y su pureza mediante HPLC analítica usando una columna de nucleosil C19 de 250 x 4,6 mm. Para esta purificación se utilizó un gradiente de acetonitrilo del 10 al 60%. Para obtener el perfil cromatográfico, se midió la diferencia de potencial eléctrico de la fracción recogida. El único pico del perfil cromatográfico corresponde con el péptido VEA195 que se secó, se resuspendió en agua purificada y después se utilizó para la inmunización del ratón para producir los anticuerpos específicos.

25 Ejemplo 2: Inmunohistoquímica en tejidos renales

2.1 - Protocolo

30 Se cortaron y montaron en portaobjetos secciones de cinco micrómetros de biopsias de riñón de pacientes injertados, fijadas en formalina e incluidas en parafina. La determinación inmunohistoquímica (IHC) de VEA195 previamente secuenciado de la proteína de 25-30 kDa se realizó en un sistema de tinción automatizado (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, EE.UU.) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Estos portaobjetos se desparafinaron en xileno, se deshidrataron mediante tres pases en alcohol y se transfirieron al kit Ventana que incluía solución que bloquea la actividad de peroxidasa endógena. También se insertaron en la plataforma anticuerpos monoclonales de ratón anti-VEA195, tales como 2C7D10E5 (E5), 4H7A7G9 (G9) y 1H8C9C10C7 (C7) y se distribuyeron automáticamente en dilución a 1:100 durante el ensayo. Estos portaobjetos se revelaron en DAB Map (DAB = diaminobencidina) y se contratiñeron con hematoxilina (Ventana) y se montaron finalmente en solución de tolueno (Eukit, CML, Nemours, Francia).

2.2 - Resultados

40 Se ilustran en la figura 1. La biopsia del receptor de injerto renal que padece rechazo de injerto muestra típicamente la tinción de una proteína de 25-30 kDa tanto en la membrana glomerular basal como en la parte de los túbulos del riñón. La tinción citoplasmática en las células tubulares es muy intensa (figura 1-B). No aparece tinción de la proteína de 25-30 kDa en la biopsia de los receptores de injertos renales sanos (es decir, los que no padecen rechazo de injerto) (figura 1-A).

Ejemplo 3: Resultados de cromatografía ascendente inmunitaria

3.1 - Síntesis de anticuerpos monoclonales

45 Se inyectaron aproximadamente 50 mg por ratón de péptido VEA195 diluido en PBS a un total de 4 ratones. La primera inyección se efectuó por vía intraperitoneal usando péptido VEA195 emulsionado en adyuvante completo de Freund. La nueva inyección se realizó el día 21 y 42 con un ensayo de sangrado los días 0, 14, 35 y 56. Una vez completado el último ensayo de sangrado se realizó un ensayo ELISA. Después del último sangrado, el bazo del ratón que mejor reaccionaba se extirpó quirúrgicamente. Se aislaron los linfocitos y se recogieron en medio de cultivo.

50 Para mantener vivos a los linfocitos productores de inmunoglobulina, se fusionaron con una línea celular de mieloma de ratón [mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC CRL 8287)] en presencia de polietilenglicol. Se realizó una separación de linfocitos fusionados y no fusionados y células de mieloma en placas rellenas con medio HAT (Hipoxantina-Aminoptericina-Timidina). Las células supervivientes se recogen y constituyen el hibridoma. Los sobrenadantes de los

5 cultivos celulares se ensayan en presencia de anticuerpos específicos de antígeno y las células de hibridoma se congelan para su cultivo posterior. Después se lleva a cabo el aislamiento de la línea celular de hibridoma productora de anticuerpo realmente monoclonal diluyendo la mezcla en placas multipocillo. Mediante este procedimiento, se selecciona una "célula madre" que secreta un único anticuerpo después de una cascada de selección y clonación de nuevas células, ELISA y controles microscópicos.

Mediante el uso de esta técnica, se producen anticuerpos monoclonales de isotipo IgG1 o IgG2 kappa contra el péptido VEA195: 2C7D10E5 (E5), 4H7A7G9 (G9) y 1H8C9C10C7 (C7).

3.2 - Protocolo de inmunoensayo

10 En este ensayo, se usa la tecnología en sándwich de doble anticuerpo para posibilitar la detección de la proteína completa de la que deriva el péptido VEA195 en sueros de pacientes injertados. Este ensayo está basado en la inmunocromatografía, utilizando dos anticuerpos específicos producidos contra el péptido VEA195 y un anticuerpo no específico producido contra Ig de ratón. El anticuerpo de captura monoclonal E5 reconoce específicamente un epítipo de VEA195. El anticuerpo migratorio G9 conjugado con oro coloidal reconoce un segundo epítipo del péptido VEA195. La Ig anti-ratón es un anticuerpo de captura de control que sirve como control negativo. Los tres anticuerpos se unieron linealmente a la membrana de acetato de celulosa. La tira se sumerge en un tubo de ensayo que contiene el suero de paciente diluido en tampón de migración (Na₂HPO₄ 50 mM, BSA al 1% y Na₃ al 0,10%, pH 7,4 de BIOSYNEX). El complejo formado por anticuerpo de captura E5-proteína de la que procede el péptido VEA195-anticuerpo migratorio G9 conjugado con oro coloidal forma la línea de ensayo y el complejo compuesto de anticuerpo de captura anti-Ig de ratón-anticuerpo migratorio G9 conjugado con oro coloidal forma la línea de control. 15 La migración de los anticuerpos conjugados con oro coloidal sucede a lo largo de la tira del ensayo. El resultado se leyó después de 10 minutos. Cuando tanto la línea de ensayo como la línea de control son rojas, significa que la correspondiente muestra de suero era positiva. En caso de que solo la línea de control sea roja, se indica un resultado negativo.

3.3 - Resultados

25 Se ilustran en la figura 2. Hay dos líneas presentes en la tira realizada con el suero de pacientes con injertos renales que padecen de rechazo de injerto (figura 2-b): la línea superior corresponde a la línea de control y la banda inferior es la línea de ensayo. En la tira de ensayo realizada con el suero de pacientes con injerto renal que no padecen de rechazo de injerto solo puede verse la línea de control (figura 1-a).

30 Se efectuó un estudio comparativo entre el ensayo inmuno-cromatográfico con oro coloidal (CIA) y la inmunohistoquímica (IHC), realizado con tinción de hematoxilina y eosina en secciones del órgano injertado se hizo en un total de 20 muestras de suero de pacientes con injertos renales (tabla 1, a continuación). El diagnóstico final se estableció de acuerdo con criterios IHC. Todos los experimentos se realizaron con las muestras codificadas y enmascaradas. Estos resultados se recogen en la tabla 1.

35 Tabla 1: Estudio comparativo entre CIA e ICH. AHR = rechazo humoral agudo; ACR = rechazo celular agudo; PTLD = enfermedad linfoproliferativa post-trasplante; ATN = necrosis tubular aguda; BP = límite patológico; CITN = necrosis tubular intersticial crónica; ND = no realizado.

Categorías paciente	del D paciente	del Fecha muestreo	de Análisis IHC	Análisis CIA	Diagnóstico definido por la patología
A1	16	22/04/2008	-	-	sin rechazo
	17	27/05/2008	-	-	
	27	26/06/2008	-	-	
A2	11	05/02/2008	-	-	pielonefritis aguda - sin rechazo
	13	07/02/2008	-	-	
B	1	25/10/2006	BP	+	AHR
		13/02/2008	+	+	
		27/06/2008	+	+	
	12	18/06/2008	+	+	
C	14	25/06/2008	BP	+	ACR
	28	11/06/2008	-	+	ND
		18/08/2008	+	+	ACR

(continuación)

Categorías de paciente	ID del paciente	Fecha de muestreo	Análisis IHC	Análisis CIA	Diagnóstico definido por la patología
	34	28/02/2006	BP	ND	ND
		08/08/2006	BP	ND	ND
		28/01/2008	BP	+	ACR + PTLD
	15	02/05/2007	+	+	ACR + necrosis cortical
D	9	31/01/2008	+	+	ATN
	10	23/01/2008	+	+	CITN
	29	29/01/2008	-	+	crioglobulinemia
	30	09/04/2008	+	+	glomerulonecrosis extracapilar

Las 5 muestras de suero que salieron negativas con ambos ensayos pertenecen a los pacientes injertados que no padecen de rechazo de injerto. Este grupo de pacientes puede subdividirse en dos categorías: A1 son receptores sanos y A2 son receptores que padecen de infecciones bacterianas. Los pacientes que pertenecen a estas categorías A1 y A2 no padecen ninguna insuficiencia renal. 13 sueros fueron positivos para CIA usando anticuerpos anti-VEA195. Entre esas muestras positivas, 4 se referían a un rechazo humoral agudo (AHR) y 4 a un rechazo celular agudo (ACR). Otras formas de disfunción renal fueron reactivas en 4 muestras de suero, principalmente referidas con necrosis tubular aguda (ATN), necrosis tubular intersticial crónica (CITN) o glomerulonecrosis extracapilar. Los pacientes 1 (primera muestra), 14 y 34 (tercera muestra) aparecieron en los límites patológicos (BP, es decir, se encontraron moléculas inflamatorias en limitada cantidad) con IHC que requiere realizar otra biopsia. Las biopsias realizadas unos meses más tarde confirmaron los resultados obtenidos previamente con el ensayo CIA. Estos resultados demuestran claramente que los anticuerpos anti-VEA195 son biomarcadores fiables para la insuficiencia renal, incluido el rechazo del injerto.

Ejemplo 4: Ensayos ELISA

4.1 - Protocolo

Las placas de microtitulación se cubrieron con 100 µl de suero de los pacientes diluidas en 20 µl de tampón carbonato 50 mM, pH 9,4 durante toda la noche a 4°C. Las placas de microtitulación se lavaron 3 veces con PBS-tampón Tween 20 al 0,05%. Las placas se incubaron con 250 µl de tampón PBS y 150 µl de una solución al 5 % de BSA a temperatura ambiente durante 2 horas y lavadas 3 veces con PBS-tampón Tween 20 al 0,05%. Cada pocillo recibió 100 µl de una dilución 1:4000 de anticuerpos E5 en PBS-BSA al 1 % y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas de microtitulación se lavaron 3 veces con PBS-tampón Tween 20 al 0,05%. El anticuerpo IgG de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa se añade a 1:3000 a cada pocillo y se incuba durante 30 minutos a 37°C. Las placas de microtitulación se lavan 3 veces con PBS-tampón Tween 20 al 0,05%. Después se añade sustrato de OPD (orto-fenilendiamina) durante 10 minutos. La reacción se detiene mediante la adición de una solución de H₂SO₄ 4 mM. Las placas de microtitulación se leen entonces a 415 nm con un lector óptico.

4.2 - Resultados

Los resultados se muestran a continuación en la tabla 2. El ensayo ELISA se realizó con muestras de suero de donantes de sangre (T) para determinar el valor de límite, el cual parece ser superior a 0,061 unidades de DO en este ensayo. Los pacientes se ensayaron para el rechazo del injerto varios meses después de los ensayos de ELISA.

Tabla 2: realización de ensayo ELISA anti-VEA195 en muestras de suero de receptores injertados. AHR = rechazo humoral agudo; ACR = rechazo celular agudo

Categorías de paciente	ID del paciente	Fecha de muestreo	Valores de DO (415 nm)	Diagnóstico definido por la patología
Donantes de sangre	100	01/03/2007	0,048	Ninguno
		01/04/2007	0,051	
		08/05/2007	0,045	
		15/05/2007	0,050	

ES 2 615 818 T3

(continuación)

Categorías de paciente	ID del paciente	Fecha de muestreo	Valores de DO (415 nm)	Diagnóstico definido por la patología
	200	20/07/2007	0,039	
		03/08/2007	0,054	
		18/08/2007	0,061	
		30/08/2007	0,057	
		12/09/2007	0,048	
	300	12/04/2008	0,048	
		30/04/2008	0,044	
		15/05/2008	0,038	
		27/05/2008	0,047	
A1	400	10/07/2008	0,047	sin rechazo
	500	15/08/2008	0,061	
B	600	20/04/2006	0,093	AHR
		12/05/2006	0,044	
		30/05/2006	0,056	
	700	30/04/2007	0,055	
		12/05/2007	0,057	
		30/05/2007	0,084	
		24/06/2007	0,137	
C	800	05/05/2007	0,288	ACR
		23/06/2007	0,135	
	900	08/02/2006	2,436	
		22/02/2006	2,691	
		15/03/2006	1,281	
	1000	30/03/2005	2,377	
		06/04/2005	2,638	
		18/04/2005	2,560	
		30/04/2005	2,557	
	1100	08/05/2005	2,797	
		03/04/2006	0,157	
15/05/2006		0,161		
28/05/2006		2,661		

5 Se ensayaron 34 muestras de suero de 8 receptores con injertos renales con anticuerpos E5 anti-VEA195. En donantes de sangre, es decir, las personas a las que no se practican injertos, el valor de DO está por debajo de 0,061. En pacientes injertados que no padecen de rechazo de injerto varios meses después de que se realicen los ensayos ELISA, el valor de DO estaba también por debajo de 0,061. Para los pacientes injertados que padecen rechazo de injerto, varios meses después de que se realicen los ensayos ELISA, el valor de DO estaba por encima de 0,084 a más de 2,7. En consecuencia, la cantidad de proteína de 25-30 kDa, de la que deriva el péptido

VEA195, en muestras de sangre podría ser una buena herramienta para la predicción del rechazo de injertos. El perfil cinético de expresión de la proteína de 25-30 kDa en los receptores de trasplante renal está probablemente influenciado por el estado de la enfermedad y relacionado con el tratamiento inmunosupresor de los pacientes.

5 Los ensayos muestran que la presente invención podría ser una herramienta eficaz y que podría proporcionar procedimientos para evaluar la insuficiencia del órgano injertado y de manera destacable, el estadio más perjudicial ilustrado en el presente documento por el rechazo de injerto.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Félix Agbalika Agbalika, Félix

<120> Biomarcadores para el pronóstico y diagnóstico *in vitro* de rechazo de injertos y trasplantes

10 <130> IOB 11 AA AGB VEA1

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 11

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido derivado de Homo sapiens

<400> 1

20

Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp
1 5 10

<210> 2

<211> 33

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> molécula de ácido nucleico derivada de Homo sapiens

<220>

30 <221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> R e s a o g

<220>

35 <221> misc_feature

<222> (6) .. (6)

<223> R e s a o g

<220>

40 <221> misc_feature

<222> (9) .. (9)

<223> N e s a, c, t o g

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> H e s a, c, o t

45

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> Y e s c o t

50

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

5 <223> R e s a o g
<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> R e s a o g

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> N e s a, c, t o g

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> N e s a, c, t o g

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> R e s a o g

<400> 2
aargaracna thaaygarga rgcngcngar tgg 33

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
2. Una molécula de ácido nucleico capaz de codificar un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 en la que dicho ácido nucleico es la SEQ ID NO: 2.
- 5 3. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un epítipo que consiste en el péptido de acuerdo con la reivindicación 1.
4. Los hibridomas depositados en el CNCM (París) a tenor del Tratado de Budapest el 4 de mayo de 2011, con los números de referencia CNCM I-4479, CNCM I-4480 y CNCM I-448, que secretan un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un epítipo que consiste en el péptido de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 5. Un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 3 que se secreta por uno de los hibridomas con número de referencia CNCM I-4479, CNCM I-4480 y CNCM I-4481, tal como se definen en la reivindicación 4.
6. Una composición que contiene un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 5.
- 15 7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso como herramienta de pronóstico, diagnóstico o control para evaluar una insuficiencia de un órgano injertado, de manera destacable, del rechazo de injertos o trasplantes.
8. Un procedimiento *in vitro* para predecir o realizar el pronóstico o diagnóstico de una disfunción del órgano trasplantado, de manera destacable, el rechazo de un injerto o trasplante en un mamífero, que comprende las siguientes etapas:
 - 20 (i) determinar la presencia o cantidad de péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1,
en una muestra biológica de dicho mamífero.
9. Un procedimiento *in vitro* para predecir o realizar el pronóstico o diagnóstico de una disfunción del órgano trasplantado, de manera destacable, el rechazo de un injerto o trasplante en un mamífero, que comprende las siguientes etapas:
 - 25 (i) determinar la presencia o cantidad de anticuerpos producidos contra el péptido de la SEQ ID NO: 1,
en una muestra biológica de dicho mamífero.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en el que el nivel de péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, o de anticuerpos generados contra el péptido de la SEQ ID NO: 1 se mide utilizando un inmunoensayo.
- 30 11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el anticuerpo se secreta por uno de los hibridomas depositados en el CNCM (París) a tenor del Tratado de Budapest el 4 de mayo de 2011, con los números de referencia CNCM I-4479, CNCM I-4480 y CNCM I-4481.
- 35 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que la muestra biológica es una muestra de fluido corporal.
13. Un kit para el pronóstico o diagnóstico *in vitro* de una insuficiencia del órgano injertado, de manera destacable, del rechazo de injertos y trasplantes que comprende:
 - 40 (i) un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 5 adecuado para unirse a un epítipo que consiste en un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1,
(ii) un anticuerpo acoplado a un sistema de detección adecuado para unirse al complejo de anticuerpo-antígeno, y opcionalmente un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
14. El uso *in vitro* del péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 como marcador para el pronóstico o diagnóstico de una insuficiencia del órgano injertado, de manera destacable, del rechazo de injertos o trasplantes en un mamífero.
- 45 15. El uso *in vitro* de una molécula de ácido nucleico, en la que dicho ácido nucleico es la SEQ ID NO: 2, capaz de codificar un péptido de la SEQ ID NO: 1 como marcador para el pronóstico o diagnóstico de una insuficiencia del órgano injertado, de manera destacable, del rechazo de injertos o trasplantes en un mamífero.

FIGURA 1

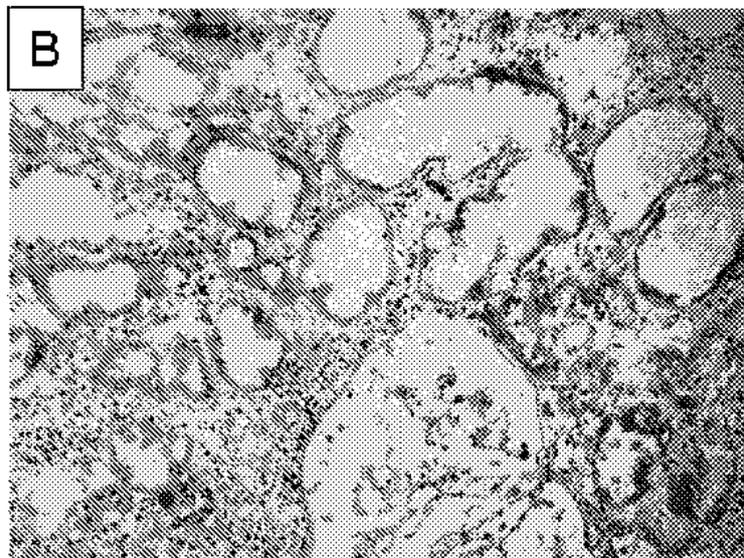
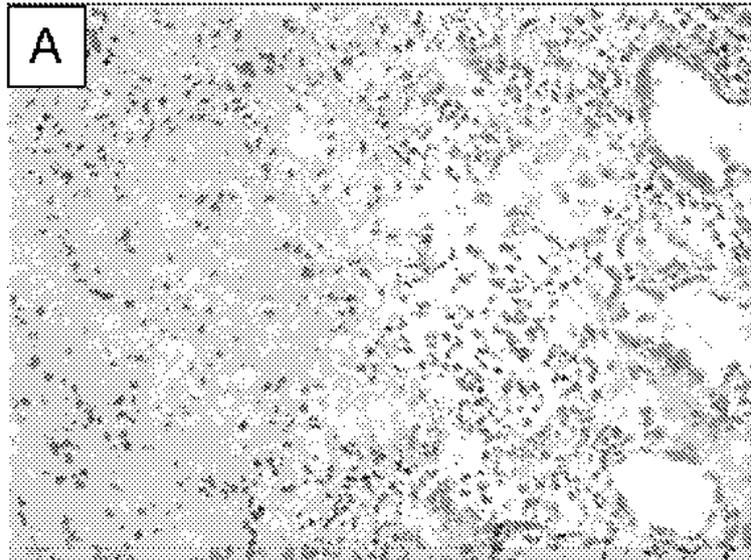


FIGURA 2

