

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 673**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2016 PCT/EP2016/065383**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2017 WO17001600**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2016 E 16736028 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3317665**

54 Título: **Biomarcador para predecir la falta de función primaria de un injerto de hígado**

30 Prioridad:

02.07.2015 EP 15174982

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

10.06.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT GENT (100.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent, BE**

72 Inventor/es:

**VAN VLIERBERGHE, HANS y
VERHELST, XAVIER**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 765 673 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

Biomarcador para predecir la falta de función primaria de un injerto de hígado

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere al campo técnico del trasplante de hígado. La presente invención describe un conjunto de biomarcadores que se pueden usar para evaluar la calidad del injerto de hígado antes del trasplante. Más específicamente, la presente invención describe un procedimiento para predecir la aparición de falta de función primaria (PNF) de un injerto de hígado determinando la abundancia relativa de los glicanos subgalactosilados en el N-glicoma perfundido de dicho hígado antes de trasplante.

Antecedentes de la técnica

10 El trasplante de hígado es el único tratamiento curativo para la enfermedad hepática en etapa terminal, insuficiencia hepática aguda y pacientes seleccionados con cáncer de hígado. Cada año se llevan a cabo más de 20.000 trasplantes de hígado en todo el mundo y esta actividad se concentra en el mundo Occidental usando donantes de órganos cadáveres.

15 Una complicación rara pero potencialmente mortal después del trasplante de hígado es la PNF. La PNF se define como la ausencia de la función inicial después de trasplante. Dicha evidencia incluiría no solo signos claros de insuficiencia hepática total (p. ej., hipoglucemia profunda, coagulopatía incorregible, coma en fase IV, insuficiencia renal, acidosis y choque cardiodinámico), sino también otros signos de daño irreparable para el órgano (es decir, aumentos masivos en transaminasas junto con aumentos diarios continuos en bilirrubina, insuficiencia renal persistente, confusión mental y coagulopatía persistente). El único tratamiento es un trasplante urgente en el plazo de 24-48 horas¹. La incidencia de la PNF varía de 2 a 10% y es responsable de 36% de los retrasplantes. La PNF está asociada con un receptor femenino, esteatosis del injerto de hígado donando y un tiempo de isquemia fría mayor².

Por lo tanto, es necesario predecir la aparición de PNF basada en la evaluación de la calidad del hígado donando.

25 La estrategia actual para la "selección" del órgano donando se basa en una evaluación clínica del órgano donado usando parámetros clínicos que incluyen la edad, sexo, raza, comorbilidad, causa de muerte, valores bioquímicos (enzimas hepáticas), asignación y tipo de donante y tiempo de isquemia. Basándose en estos parámetros se ha desarrollado un Índice de Riesgo de Donante³, con una adaptación para la región de eurotrasplante (el DRI de eurotrasplante (ET-DRI))⁴, que proporciona una estimación de la posible disfunción del injerto, pero no una evaluación formal de la calidad del injerto. Además, el DRI a menudo no predice la PNF. Se han estudiado biomarcadores para la viabilidad en el tejido hepático (que necesita una biopsia de hígado) o perfundido. Las muestras de perfundido son fáciles de recoger y a diferencia de una biopsia de hígado que solo representa una parte pequeña del hígado, representan la función hepática global. En relación con esto, el perfundido se ha estudiado hace décadas con el fin de predecir la insuficiencia orgánica después de trasplante de hígado. Informes previos proponen la AST, una enzima hepática usada de forma rutinaria, como un marcador para la viabilidad del injerto⁵.

35 Sin embargo, la sensibilidad y especificidad son insuficientes. Otros autores han descrito el ácido hialurónico en el perfundido como un marcador para la PNF, con un valor predictivo negativo alto para la aparición de PNF⁶. Se han propuesto otros biomarcadores experimentales en el perfundido que usan HDmiR, miARN derivado de hepatocitos, pero se centran en otros parámetros de resultados distintos de la PNF⁷.

40 Una nueva estrategia para aumentar la calidad de los órganos donados es el uso de la perfusión en máquina en lugar del almacenamiento en frío. Durante el transporte los recipientes de órganos se perfunden activamente, lo cual podría mejorar el resultado del órgano y también aumentar el conjunto de órganos donados⁸.

Sin embargo, el uso de perfusión en máquina necesita urgentemente biomarcadores fiables para evaluar la viabilidad del órgano durante y después de la perfusión.

45 Además del uso de perfusión en máquina, también una disminución de la calidad de los órganos y una demanda creciente de trasplantes de hígado urgen a buscar un biomarcador robusto para la calidad del injerto de hígado.

50 El glicoma se define como la mezcla de estructuras de carbohidratos presentes en la muestra biológica. Cuando estas estructuras de glicanos están unidas a un resto de asparagina de las proteínas, se define como el N-glicoma. A principios del 2000, Callewaert et al.⁹ desarrollaron una plataforma para el perfil cuantitativo de alto rendimiento y alta sensibilidad del N-glicoma, usando un equipo de análisis de fragmentos de ADN (común en laboratorios de genética molecular). Esta técnica se aplicó con éxito al análisis del N-glicoma del suero y llevó al desarrollo de biomarcadores para la cirrosis hepática (GlycoCirrhoTest)¹⁰, fibrosis hepática (GlycoFibroTest)¹¹, y esteatohepatitis no alcohólica (GlycoNashTest)^{12,13}.

Verhelst et al.¹⁴ describieron además la glicómica como una herramienta para el análisis del líquido de conservación en el trasplante de hígado. Estos autores demostraron que los electroferogramas o perfiles de N-glicoma de

perfundido del hígado antes de la implantación, muestran una similitud importante con los electroferogramas o perfiles de N-glicoma del suero de voluntarios humanos sanos.

Verhoeven et al.⁷ describen que la PNF del injerto de hígado durante la conservación en máquina se puede evaluar determinando el grado de esteatosis del injerto. Blomme et al.¹² describen que los biomarcadores basados en glicanos se pueden usar para medir la presencia y el grado de inflamación lobular en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Sin embargo, este último biomarcador claramente no es un marcador de la presencia de esteatosis como se confirma por los datos presentados en la presente invención. Además, estos últimos autores determinaron dichos N-glicanos en el suero, no en el perfundido, de pacientes con enfermedad de hígado graso no alcohólico.

Considerados juntos, la existencia de un glicomarcador robusto y fiable que se pueda usar para predecir la PNF no se ha descrito o sugerido.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Ejemplo de un perfil de N-glicanos entero obtenido usando electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforos asistida por secuenciador de ADN (DSA-FACE). La abundancia relativa de NGA2F, NGA2FB y NG1A2F en el perfil de N-glicoma total aumenta en el perfundido de pacientes con PNF (Panel A. Marcado en rojo - el pico 3 y 4 son isómeros) pero no en pacientes sin PNF (Panel B). Además, un paciente que sufrió trombosis arterial hepática pronto después del trasplante necesitando retrasplante urgente, no mostró aumento de NGA2F, NGA2FB y NG1A2F (Panel C).

Figura 2: La abundancia relativa de NGA2F en el perfil de N-glicoma total es mayor en el perfundido de pacientes con PNF y puede predecir la PNF.

Figura 3: La clasificación de pacientes usando un algoritmo C4.5 discrimina entre receptores de trasplante de hígado con PNF y sin PNF usando un corte para NGA2F de 10,8.

Figura 4: Representaciones esquemáticas de N-glicanos de la presente invención: N-glicano núcleo- α -1,6-fucosilado biantenarior, agalactosilado (NGA2F); N-glicano núcleo- α -1,6-fucosilado biantenarior bisecante, agalactosilado (NGA2FB); N-glicanos núcleo- α -1,6-fucosilados biantenarios, monogalactosilados (NG1A2F)

Figura 5: El perfil de N-glicanos de las muestras concentradas en perfundido era comparable con el perfil de N-glicanos típico de las proteínas del suero humano totales. Figura 5a. Perfil de N-glicanos en perfundido. Figura 5b. Perfil de N-glicanos en suero humano. Figura 5c. Caracterización del perfil de N-glicanos en suero humano.

Figura 6: La concentración del perfundido permite el análisis del perfil de N-glicanos usando el método en solución. La figura 6 presenta un ejemplo del perfil de N-glicanos de proteínas totales con la muestra LTX 100 no concentrada (figura 6a), la muestra concentrada con el filtro de 10 kDa (figura 6b) y los dos controles, el filtrado después de la etapa de concentración de la muestra de LTX 100 (figura 6c) y la muestra de blanco que es el líquido de conservación (figura 6d).

Figura 7: La esteatosis no es predictiva de la aparición de PNF (el pico 1 representa NGA2F).

Descripción de la invención

La presente invención describe un nuevo enfoque para la estimación de la calidad del injerto de hígado basada en el análisis de N-glicanos de fluido de perfusión (llamado también perfundido) en el que se ha transportado el hígado.

De hecho, la presente describe un estudio con una cohorte de 54 trasplantes de hígado en donde 3 pacientes desarrollaron PNF: los 3 pacientes con PNF tenían una notable regulación por aumento de NGA2F (N-glicano núcleo- α -1,6-fucosilado biantenarior, agalactosilado) que los podía discriminar significativamente con 100% de precisión de pacientes sin PNF.

En estos pacientes también se observó un aumento de la abundancia relativa de otros glicanos subgalactosilados en el glicoma del perfundido que incluían NGA2FB (N-glicano núcleo- α -1,6-fucosilado bisecante biantenarior, agalactosilado) y NG(1)A2F (N-glicanos núcleo- α -1,6-fucosilado biantenarios, monogalactosilados).

Por lo tanto, la medición del/de los glicomarcadores NGA2F y/o NGA2FB y/o NG1A2F valora la calidad del injerto del donante frente al riesgo de PNF y permite descartar órganos no seguros del conjunto de órganos donados, con el fin de evitar trasplantes de hígado inútiles. El término "y/o" se refiere a la medición de: NGA2F solo, NGA2FB solo, NG1A2F solo, NGA2F y NGA2FB, NGA2F y NG1A2F, NGA2FB y NG1A2F, o, NGA2F y NGA2FB y NG1A2F con el fin de evitar trasplantes de hígado inútiles.

La presente invención se refiere por lo tanto, en primera instancia, a un procedimiento para predecir la aparición de falta de función primaria de un injerto de hígado, que comprende:

- recoger un perfundido de un hígado obtenido de un donante, y

- determinar la abundancia relativa del N-glicano núcleo- α -1,6-fucosilado biantenarico, agalactosilado (NGA2F) en el perfil de N-glicanos totales en dicho perfundido, y/o la abundancia relativa del N-glicano núcleo- α -1,6-fucosilado bisecante biantenarico, agalactosilado (NGA2FB) en el perfil de N-glicanos totales en dicho perfundido y/o la abundancia relativa de los N-glicanos núcleo- α -1,6-fucosilados biantenaricos, monogalactosilados (NG1A2F) en el perfil de N-glicanos totales en dicho perfundido, en donde una cantidad significativamente mayor de NGA2F, NGA2FB o NG1A2F en comparación con la cantidad de NGA2F, NGA2FB o NG1A2F respectivamente en un perfundido recogido de un hígado de control, es predictivo de la aparición de falta de función primaria de un injerto de hígado.

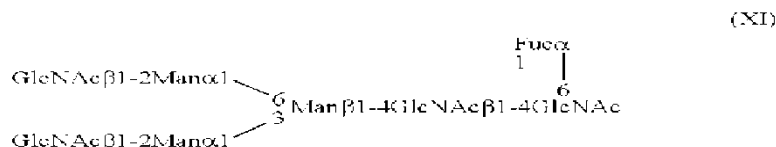
El término "PNF" se define como la ausencia de la función inicial después de trasplante. Dicha evidencia incluiría no solo signos claros de insuficiencia hepática total (p. ej., hipoglucemia profunda, coagulopatía incorregible, coma en fase IV, insuficiencia renal, acidosis y choque cardiodinámico), sino también otros signos de daño irreparable para el órgano (es decir, aumentos masivos en transaminasas junto con aumentos diarios continuos en bilirrubina, insuficiencia renal persistente, confusión mental y coagulopatía persistente).

Las expresiones "predice la aparición de falta de función primaria de un injerto de hígado" se refiere a predecir de una manera fiable si el hígado donado desarrollará PNF después de trasplante.

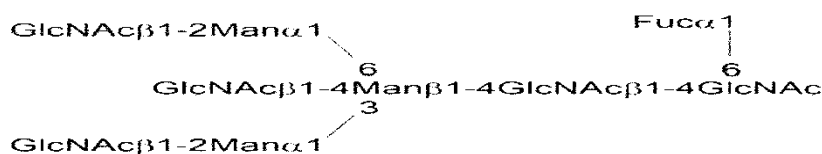
Las expresiones "obtención de un hígado" se refiere a prácticas bien conocidas para conseguir y transportar hígados donados que serán trasplantados. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico "in vitro" aplicado en un hígado después de que dicho hígado se haya extraído de un cuerpo humano o animal y antes de que dicho hígado sea trasplantado en otro cuerpo humano o animal.

Las expresiones "recoger un perfundido" se refieren a lavar con chorro dicho hígado con la solución en la que dicho hígado donado es transportado y posteriormente recoger dicha solución que comprende entonces proteínas producidas por las células hepáticas. Ejemplos no limitantes de disoluciones para transportar hígados son solución de histidina-triptófano-cetoglutarato (Custodiol HTK, Essential Pharmaceuticals, LLC, Pennsylvania, EE.UU.) o de Wisconsin (Viaspan, Duramed Pharm Inc, Pomona, NY). Se da un ejemplo más detallado, pero no limitante, de cómo recoger un perfundido después en la sección de ejemplos.

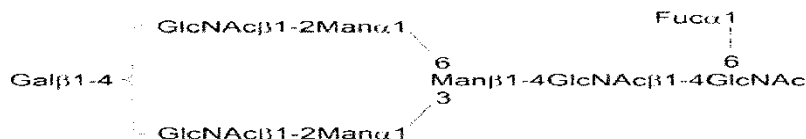
La expresión "el oligosacárido N-glicano-agalacto-núcleo- α -1,6-fucosilado biantenarico (NGA2F)" se refiere a una estructura de tipo oligosacárido biantenarico, fucosilado, agalacto, asialo:



La expresión "el oligosacárido N-glicano agalactosilado núcleo- α -1,6-fucosilado bisecante biantenarico (NGA2FB)" se refiere a una estructura de tipo oligosacárido biantenarico bisecante, fucosilado, agalactosilado, asialo:



La expresión "el oligosacárido N-glicano monogalactosilado núcleo- α -1,6-fucosilado biantenarico (NG1A2F)" se refiere a una estructura de tipo oligosacárido biantenarico, fucosilado, monogalactosilado, asialo:



Las expresiones "determinar la abundancia relativa de NGA2F/NGA2FB/NG1A2F en el perfil de N-glicoma total se refiere a cualquier método conocido para cuantificar (relativamente) la presencia de moléculas de NGA2F, NGA2FB o NG1A2F en dicho perfundido. Específicamente, estas últimas expresiones se refieren a "determinar la cantidad de NGA2F NGA2FB o NG1A2F por electroforesis capilar" y más específicamente estas últimas expresiones se refieren a "determinar la cantidad de NGA2F, NGA2FB o NG1A2F mediante electroforesis capilar asistida por fluoróforos asistida por secuenciador de ADN" como se describe en Callewaert et al. (2004 Nat Med: 429)10. Se pueden usar otras técnicas para la cuantificación/perfil de glicanos que incluyen espectrometría de masas MALDI-TOF, cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada, cromatografía líquida de alto rendimiento y matriz de lectina.

La preparación y marcaje de los glicanos en el perfundido para la secuenciación se puede llevar a cabo usando el

método de desglicosilación en membrana descrito por Laroy et al.¹⁵. Se ha desarrollado un método de desglicosilación en solución para el perfil de glicanos en el suero en un contexto clínico (tiempo de preparación de la muestra menos de 2 horas). Puesto que se necesita un volumen alto de muestra del perfundido (más de 200 µl) para el método de desglicosilación en membrana (comparado con < 10 µl de suero) las muestras deben concentrarse antes de aplicar el ensayo de desglicosilación en solución.

Las expresiones "una cantidad significativamente mayor de NGA2F NGA2FB o NG1A2F, en comparación con la cantidad de NGA2F NGA2FB o NG1A2F, respectivamente, en un perfundido recogido de un hígado de control" significa un aumento de la abundancia relativa del N-glicano citado con respecto al perfil de N-glicoma total.

El valor de corte de exclusión de 10,8% se basa en la diferencia entre la abundancia de NGA2F en glicomas de pacientes con PNF y sin PNF. No se observó superposición (Fig. 3). Se usó un algoritmo C4. 516 para determinar este valor de corte y confirmar la clasificación correcta de todos los casos (Fig. 4). Un C4.5 es un algoritmo usado para generar un árbol de decisión y se puede usar para la clasificación de subconjuntos en un conjunto de datos. En la solicitud de los autores de la invención los pacientes se clasificaron según tuvieran PNF o no tuvieran PNF de acuerdo con la abundancia relativa de NGA2F en relación con el perfil de N-glicoma total en el perfundido.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento como se ha descrito antes, en donde dicha determinación de la cantidad relativa de NGA2F, NGA2FB o NG1A2F en dicho perfundido se lleva a cabo por electroforesis capilar.

Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento como se ha descrito antes, en donde dicha electroforesis capilar es electroforesis capilar asistida por fluoróforos asistida por secuenciador de ADN.

La presente se refiere además a un procedimiento como se ha descrito antes, en donde dicha electroforesis capilar se lleva a cabo en los N-glicanos que son liberados de proteínas presentes en dicho perfundido y que posteriormente se derivatizan con el fin de permitir su detección y/o cuantificación/perfilado.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento como se ha descrito antes, en donde dicha derivatización comprende, como ejemplos no limitantes, marcaje de dichos N-glicanos con ácido 8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico y/o desialilación. Debería estar claro que, dependiendo de la metodología usada, también se pueden usar otros marcadores.

La presente invención se refiere además a un procedimiento como se ha descrito antes, en donde dicho hígado de control es un hígado que después de trasplante no da como resultado la aparición de falta de función primaria.

La presente invención se refiere también a un procedimiento como se ha descrito antes, en donde dicho perfundido de dicho hígado se concentra antes de determinar dicha abundancia relativa de dichos N-glicanos.

Por lo tanto, la presente invención se refiere también en esencia al uso del N-glicano NGA2F, NGA2FB y/o NG1A2F para predecir la aparición de falta de función primaria de un injerto de hígado en un perfundido del hígado.

La presente invención ahora se ilustrará más mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

35 Materiales y métodos

Pacientes

Desde octubre del 2011 hasta julio del 2013, se realizaron 85 trasplantes de hígado ortotópicos en 74 pacientes adultos en el Hospital Universitario de Gante. En esta cohorte de pacientes, se pudo tomar muestras de forma prospectiva de la solución de conservación de 54 trasplantes de hígado en 52 pacientes.

La PNF se definió como la necesidad de trasplante urgente cuando un injerto no demostraba nunca ninguna evidencia de función inicial después de trasplante tras la exclusión de otras causas como trombosis arterial hepática, rechazo celular agudo. Típicamente estaba acompañado por transaminasas altas, PT bajo y bilirrubina alta.

Recogida y procesamiento de muestras

La solución de conservación se obtuvo durante el procedimiento de cirugía de banco. Los injertos de hígado se consiguieron de acuerdo con prácticas locales y se transportaron al centro de los autores de la invención en solución de histidina-triptófano-cetoglutarato (Custodiol HTK, Essential Pharmaceuticals, LLC, Pennsylvania, USA) o de Wisconsin (Viaspan, Duramed Pharm Inc, Pomona, NY). Durante el procedimiento de cirugía de banco, la vena porta izquierda se lavó por chorro con una jeringa de 20 ml de perfundido en el que se había transportado el injerto bajo presión hidrostática normal. Los perfundidos se recogieron y se almacenaron inmediatamente a -21°C.

Análisis de N-glicosilación

- Las muestras de perfundido se prepararon usando el método de desglicosilación en membrana en 96 pocillos, que se ha descrito previamente en detalle⁹¹⁵. En resumen, las proteínas en 500 µl de solución de conservación se desnaturalizaron usando 1 ml de tampón de desnaturalización y posteriormente se cargaron en una placa de 96 pocillos que contenía membrana de PVDF activada con metanol. Las proteínas unidas posteriormente se reducen y se carboximetilan antes de digestión con péptido N-glicosidasa F para liberar los N-glicanos. Después los N-glicanos se marcan con ácido 8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico y el exceso de marcador se separa usando cromatografía de exclusión por tamaño (resina Sephadex G-10). Después se desialila una fracción de la muestra y después se analiza con un secuenciador de ADN ABI 3130.
- 5 Se obtuvo un perfil de N-glicanos de las proteínas del suero desialiladas para los objetos de estudio. Se cuantificaron 13 picos que eran detectables en todas las muestras usando el software Peak Scanner 2 Versión 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), y se normalizó su abundancia respecto a la intensidad de la altura total de los picos. La naturaleza de estos picos se ha identificado antes por análisis estructural¹⁰.
- 10 Se calculó el DRI de acuerdo con Feng et al.³ usando una calculadora en línea (<http://gastro.cchmc.org/calculator/donor-risk-index>). El DRI de eurotrasplante (ET-DRI) se calculó de acuerdo con Braat et al.⁴.
- 15

Análisis estadístico

- Se usó SPSS 22.0. Los grupos se compararon usando la prueba U de Mann Whitney. Se compararon las expresiones de glicoma entre pacientes con PNF y sin PNF. Las diferencias se estudiaron usando regresión logística con selección por pasos hacia adelante con el fin de identificar perfiles de abundancia de glicanos discriminantes.
- 20

Resultados

1) Población de pacientes

- El análisis de N-glicanos se llevó a cabo en perfundido de 54 trasplantes de hígado de 52 pacientes. Tres pacientes desarrollaron una PNF. Dos pacientes más necesitaron un retrasplante urgente, ambos debido a una trombosis arterial hepática, y no se consideraron como PNF. Las características de los pacientes se resumen en la tabla 1. Se observaron diferencias significativas entre los pacientes con PNF y sin PNF en relación con los niveles de ALT, AST e INR del receptor 48 horas después de trasplante, que reflejaban la presencia de una PNF. Es interesante que el uso de donante DCD o la elección del líquido de perfusión no estaba relacionado con la PNF. En la cohorte de los autores de la invención, el DRI no podía predecir la PNF.
- 25

Tabla 1. Características de los pacientes

	No PNF (n = 51)	PNF (n=3)	Total (n=54)	valor p
Receptor				
Características				
<i>Datos demográficos</i>				
Edad (SD)	53,5 (13,9)	43,5 (21,9)	51 (14,1)	n.s.
Sexo (H/M)	30/21	2/1	32/22	
<i>Datos bioquímicos</i>				
AST a las 48 horas (U/L) (SD)	643 (1072)	7536 (4810)	626 (1780)	0,01
ALT a las 48 horas (U/L) (SD)	522 (851)	6710 (7793)	535 (1773)	0,07
INR	1,62 (1,17)	12,5 (11,2)	1,64 (2,79)	0,06
Total bilirrubina (mg/dl) (SD)	2,7 (4,95)	7,56 (6,27)	3 (4,77)	n.s.
Donante				
Características				
Edad (SD)	46,5 (17,2)	57,5 (19,19)	46,5 (17,14)	n.s.
Sexo (H/M)	27/24	2/1	29/25	
Altura (cm) (SD)	172 (7,05)	160 (11,5)	171 (7,8)	n.s.
Peso : (cm) (SD)	78 (17,9)	60 (6,36)	75,5 (18,1)	n.s.
Perfundido (HTK/UW)	41/10	2/1	43/11	

CIT (minutos) (SD)	399 (120)	493 (10)	399 (120)	n.s.
WIT (minutos) (SD)	38 (16)	40 (11)	37 (15)	n.s.
AST (U/L) (SD)	42 (54)	22 (3)	41,5 (51)	n.s.
ALT (U/L) (SD)	32 (34)	25 (19)	32 (34)	n.s.
GGT (mg/dl) (SD)	41 (96)	20 (8)	37 (93)	n.s.
Total Bilirrubina (mg/dl) (SD)	0,62 (5.82)	0,72 (0,16)	0,64 (5.55)	n.s.
DCD	2	0	2	
DRI (SD)	1,67 (0,38)	1,71 (0,35)	1,67 (0,37)	n.s.
ET-DRI (SD)				

Las variables se expresan como medias seguidas de la desviación estándar entre paréntesis

Abreviaturas: CIT: tiempo de isquemia fría; DCD: donación después de muerte cardiaca; DRI: índice de riesgo del donante; ET: eurotrasplante; PNF: falta de función primaria; HTK: histidina-triptófano-cetoglutarato; n.s.: no significativo; SD: desviación estándar; UW: solución de la Universidad de Wisconsin; WIT: tiempo de isquemia caliente

2) El análisis de N-glicanos en la cantidad total de glicoproteínas en el perfundido es factible

La técnica usada para el análisis de N-glicanos se basa en una electroforesis capilar asistida por fluoróforos asistida por secuenciador de ADN, que se desarrolló y validó inicialmente para análisis de suero¹⁰ pero se ha usado con éxito para muestras de diferente naturaleza incluyendo los análisis de orina¹⁷.

Ahora, esta técnica se ha aplicado en el perfundido de pacientes de trasplante de hígado. Usando el protocolo estándar, se obtuvieron electroferogramas de alta calidad. Los electroferogramas son comparables a los obtenidos en el suero y muestran 13 picos. Se ha identificado que cada pico es la misma estructura de N-glicano descrita previamente en el suero.

3) El análisis de N-glicanos del perfundido puede predecir la aparición de PNF

En la cohorte de 54 pacientes de los autores de la invención, 5 pacientes necesitaron un retrasplante urgente, 3 debido a PNF y 2 debido a una trombosis arterial hepática (HAT). Es interesante que se observó un aumento en la abundancia relativa del pico 1 en todos los pacientes con PNF pero no en los pacientes con HAT (Fig. 1). El pico 1 se ha caracterizado como el NGA2F, un glicano núcleo-fucosilado biantenarío. Usando un corte de exclusión de 10,8% para la abundancia relativa de NGA2F en el perfundido, se pudieron clasificar inequívocamente 3 pacientes con PNF y predecir la aparición de PNF antes del trasplante de hígado (Fig. 2). También se observó el aumento de abundancia relativa de NGA2FB y NG1A2F en pacientes con PNF.

Los niveles de ALT en el perfundido no están relacionados con la PNF.

Se analizaron los niveles de ALT en el perfundido. No se observó un aumento de estos valores en el perfundido de pacientes con PNF.

La esteatosis del injerto de hígado donado es un factor de riesgo para la PNF, pero no predice la PNF. En esta cohorte la presencia de esteatosis no estaba relacionada con la abundancia relativa del pico 1 (=NGA2F) (Figura 7). En cambio, la abundancia relativa de NGA2F era 100% predictiva para la aparición de PNF.

En esta cohorte 3 pacientes desarrollaron PNF. Solo uno de ellos tuvo esteatosis grave. Los otros dos pacientes no tuvieron esteatosis en absoluto. Otros dos pacientes con esteatosis grave no desarrollaron PNF.

Optimización adicional del análisis de glicanos de la presente invención.

El procedimiento de preparación de muestra y marcaje de glicanos se puede optimizar más con el fin de aumentar el

tiempo de velocidad de renovación a 2 horas en lugar de los actuales 2 días. Por ejemplo, la preparación y marcaje de los glicanos en el perfundido para la secuenciación se puede llevar a cabo usando el método de desglicosilación en membrana descrito por Laroy et al., 2006. Se ha desarrollado de hecho un método de desglicosilación en solución para el perfil de glicanos en el suero en un contexto clínico (tiempo de preparación de la muestra menos de 2 horas). Puesto que se necesita un volumen alto de muestra del perfundido (más de 200 μ l) para el método de desglicosilación en membrana (comparado con < 10 μ l de suero) las muestras deben concentrarse antes de aplicar el ensayo de desglicosilación en solución.

La presente técnica no solo se lleva a cabo en secuenciadores de ADN, sino que también se pueden usar dispositivos de electroforesis capilar rutinarios que están disponibles en laboratorios clínicos rutinarios.

10 Optimización adicional del análisis de glicanos de la presente invención (II)

Materiales y métodos

Recogida de muestras

Las muestras de líquido de perfundido se han recogido durante el trasplante de hígado de cada paciente. La primera muestra de perfundido (indicada como "RECIPIENTE") del recipiente se tomó después de la preparación del hígado y lavado por chorro de la arteria hepática con líquido de perfundido. Las segundas muestras (indicadas como "VENA") se recogieron después del lavado por chorro de la vena hepática izquierda usando una jeringa de 20 ml con 20 ml de líquido de perfundido. La tercera muestra (indicada como "VÍAS BILIARES") se recogió en el recipiente después de lavado por chorro de las vías biliares con 20 ml de líquido de perfundido. Todas las muestras se recogieron en tubos de 15 ml y se almacenaron inmediatamente en congelador a -20°C sin ninguna manipulación adicional.

Etapas previas al análisis

Etapas de concentración

Las muestras humanas en líquido de conservación se concentraron con el fin de obtener una concentración de proteínas en el líquido que es similar al suero. El protocolo era como sigue: Cada muestra humana en el líquido de conservación se centrifugó 10 min a 2000 g en la centrífuga Eppendorf 5424, con el fin de sedimentar por centrifugación los residuos. El dispositivo de filtración por centrifugación de Amicon Ultra-0,5 se insertó en uno de los tubos de microcentrífuga proporcionados y se añadieron 500 μ l de muestra. El dispositivo de filtración tapado se centrifugó a 14.000 g durante 30 min. La muestra concentrada se recogió por centrifugación inversa en un nuevo tubo de microcentrífuga, poniendo el dispositivo de filtración Amicon Ultra boca abajo y centrifugando durante 2 min a 1.000 g. Para las muestras que necesitaban etapa de concentración extra, se recargaron 10 μ l de muestra concentrada en un nuevo dispositivo de filtración por centrifugación de Amicon Ultra-0,5 y se repitió todo el procedimiento.

Determinación de la concentración de proteínas

El ensayo de proteínas DC de Bio-Rad es un ensayo colorimétrico para la concentración de proteínas después de solubilización con detergente. El protocolo optimizado para muestras en líquido de perfundido es como sigue: Se preparó una curva de referencia hasta 2 mg/ml con BSA en líquido de perfundido. Se preparó una solución inicial de 100 mg/ml de BSA en líquido de perfundido. Por dilución 50x, se obtuvo la solución de referencia de 2 mg/ml (Referencia S1). A partir de S1 por dilución 2x se preparó la curva de referencia de 1 mg/ml (S2), 0,5 mg/ml (S3), 0,25 mg/ml (S4), 0,125 mg/ml (S5), 0,0625 mg/ml (S6) y el blanco (S7). Las muestras humanas se diluyeron 5x, 10x y 20x en líquido de perfundido. Se añadieron 5 μ l de BSA de referencia o muestra diluida en líquido de perfundido en una placa de 96 pocillos con fondo plano (no curvado). Se añadieron 25 μ l de reactivo A' que se había preparado previamente en un Eppendorf y 200 μ l de reactivo B. La placa se incubó 15 min a T.A. en la oscuridad y se midió la absorbancia a 690 nm. La concentración de proteínas de cada muestra humana en líquido de perfundido se determinó de acuerdo con la curva de referencia medida.

45 Procesamiento de la muestra de N-glicoma de proteínas

Los N-glicanos presentes en las proteínas en 3 μ l de las muestras concentradas se liberaron después de unión de las proteínas a una placa de PCR de 96 pocillos, se derivatizaron con ácido 8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico (APTS), desialilaron y se analizaron por DSA-FACE (electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforos asistida por secuenciados de ADN, Applied Biosystems). El protocolo optimizado para la liberación de glicanos y el marcaje usando un termociclador de PCR es como sigue: Se añadieron 2 μ l de tampón de NH_4Ac 10 mM, pH 5 que contenía SDS al 3,5% a 3 μ l de muestra en una placa de PCR de 96 pocillos. Cada muestra se mezcló pipeteando hacia arriba y hacia abajo sin crear burbujas. Los tubos bien cerrados se centrifugaron durante 1 min a 335 g y se calentaron a 95°C durante 5 min en un termociclador de PCR estándar con tapa calentada. Después de enfriar en hielo, se añadieron 5 μ l de NH_4Ac 10 mM, pH 5, que contenía solución de NP-40 al 2% y 2,5 miliunidades IUBMB de péptido N-glicosidasa F (PNGasa F, Glyko). Los tubos se mezclaron, se centrifugaron y se incubaron en el termociclador de PCR durante 10 min a 37°C con la tapa cerrada a 40°C. Posteriormente, se añadieron 5 μ l de

NH₄Ac 100 mM, pH 5 con 40 miliunidades de α (2,3,6,8,9)-sialidasa, seguido de mezclamiento hacia arriba y hacia abajo. Los tubos se cerraron bien, se centrifugaron y se incubaron en el termociclador de PCR durante 60 min a 37°C con la tapa cerrada a 40°C. Después de incubación, las muestras se evaporaron hasta sequedad durante 20 min a 80°C con los tubos abiertos. La evaporación fue completa, tras la cual se añadieron 5 μ l de la solución de marcaje (solución 1:1 de APTS 200 mM en ácido cítrico 1,2 M y NaBH₃CN 1 M en DMSO) en el fondo de los tubos. Los tubos bien cerrados se mezclaron con vórtice y se calentaron a 50°C durante 2 h. La temperatura elevada asegura cinéticas de reacción rápidas. La reacción se inactivó con 200 μ l de agua. Se usaron 20 μ l de las disoluciones resultantes para el análisis por DSA-FACE. Se llevó a cabo el análisis de datos usando el software GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems). Se cuantificaron las alturas de 12 picos en todas las muestras para obtener una descripción numérica de los perfiles y analizar estos datos.

Materiales

El acetato amónico (NH₄Ac), dodecilsulfato sódico (SDS), ácido cítrico, cianoborohidruro sódico al 95% (NaBH₃CN), dimetilsulfóxido (DMSO) y APTS (ácido 8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico 3 y albúmina de suero bovino (BSA) se adquirieron en Sigma Aldrich. Nonidet-40 (NP-40) se adquirió en Fluka Biochemika. La placa de PCR de 96 pocillos sin faldón se adquirió en Thermo Scientific y la placa de reacción de 96 pocillos MicroAmp Optical en Applied Biosystems. Las enzimas de *Arthrobacter ureafaciens* α (2 $\rightarrow$ 3,6,8,9)-sialidasa (200 mU/ μ l) y PNGasa F (600 U/ μ l NEB) fueron preparadas por el departamento del Medical Biotechnology Center (VIB, UGent). El ensayo de colorimetría (DC Protein Assay) para la concentración de proteínas se adquirió en BioRad. Los dispositivos de filtración por centrifugación Amicon Ultra-0,5 de 10K (10.000 NMWL), 30K (30.000 NMWL), 50K (50.000 NMWL) y 100K (100.000 NMWL) se adquirieron en Merck Milipore Ltd.

Resultados

Etapas previas al análisis

Etapas de concentración

Las muestras humanas en líquido de conservación se concentraron con el fin de obtener una concentración de proteínas en el líquido que es similar al suero. Los volúmenes obtenidos eran bastante bajos (aproximadamente 15-20 μ l). Para todas las muestras con etapa de concentración extra, se usaron solo 10 μ l porque el volumen era bajo. Las muestras finales con concentración extra (es decir, 2x) eran bastante viscosas.

Perfiles de N-glicanos de proteínas del suero totales

Era necesaria una concentración de proteínas alta para el protocolo de desglicosilación en solución que se optimizó para el suero (usado para detectar los N-glicanos). Los perfiles de N-glicanos obtenidos de las muestras concentradas en líquido de conservación se compararon con los perfiles de N-glicanos típicos de las proteínas de suero humano totales que se habían obtenido con la desglicosilación en membrana tradicional.

Se obtuvo un perfil de N-glicanos de proteínas desialiladas para muestras en líquido de conservación de pacientes de trasplante de hígado. El perfil de N-glicanos de proteínas totales del concentrado (LTX 100) en la muestra de líquido de conservación (Figura 5) era similar al perfil habitual de las proteínas totales del suero humano.

Todos los filtros usados (10, 30, 50 y 100 kDa) presentaban un perfil similar, con intensidad fluorescente relativa a NA2 de 1621, 1569, 1689 y 2817 para los filtros de 10, 30, 50 y 100 kDa usados (Tabla 2).

Tabla 2: Resultados de la intensidad fluorescente relativa para la etapa de concentración del ensayo 3 para la muestra LTX 100 en líquido de conservación.

	Picos alturas												Alturas de picos normalizadas (% del total)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	9'	10	11	12	
Ensayo 3 concentración perfundido	NGA2F	NGA2FB	NG1A2F1	NG1A2F2	NA2	NA2F	NA2FB	NA3	NA3Fb	NA3Fc	NA3Fbc	NA4	NA4Fb	Total
100-no conc dilución 1/125					47									47
100-(10) dilución 1/125					308									308
100-(30) dilución 1/125					795									795
100-(50) dilución 1/125					993									993
100-(100) dilución 1/125					1207									1207
C_ (10ex) dilución 1/125					no pico									0
C_ (100ex) dilución 1/125					no pico									0
100-(10ex) dilución 1/125					429									429
100-(30ex) dilución 1/125					1305									1305
100-(50ex) dilución 1/125					868									868
100-(100ex) dilución 1/125					1024									1024
100-(10) F dilución 1/125					no pico									0
100-(30) F dilución 1/125					no pico									0
100-(50) F dilución 1/125					no pico									0
100-(100) F dilución 1/125					no pico									0
solo APTS dilución 1/125					no pico									0
100-no conc atenuada					252									252
100-(10) atenuada	146	21	156	1228	1621	323	59	143	98	96	46	22	13	3972
100-(30) atenuada	146	21	153	1155	1569	308	54	137	91	97	45	21	9	3806,266667
100-(50) atenuada	154	23	143	1097	1689	329	64	133	89	105	42	20	11	3899
100-(100) atenuada	239	35	274	2541	2817	523	89	286	202	163	97	48	19	7333
C_ (10ex) amortiguada					20									20
C_ (100ex) atenuada					26									26
100-(10ex) atenuada	55	8	99	569	1250	182	45	71	41	63	16	15	11	2425
100-(30ex) atenuada	203	33	392	2117	3775	602	117	237	164	197	63	34	17	7951
100-(50ex) atenuada	164	20	260	1248	2543	410	97	154	100	129	35	13	12	5185
100-(100ex) atenuada	200	22	328	1175	3240	524	128	154	91	172	40	9	16	6099
100-(10) F atenuada					17									17
100-(30) F atenuada					no pico									0
100-(50) F atenuada					31									31
100-(100) F atenuada					35									35
solo APTS atenuada					no pico									0

*100 = LTX 100 perfundido

*C = Control negativo (líquido de perfundido)

*F = Filtrado

*ex = etapa de concentración extra de 10 µl de muestra concentrada

Sin embargo, el LTX 100 en líquido de conservación se concentró aproximadamente 6x con los filtros de 10, 30, 50 kDa y 11x con los filtros de 100 kDa. La figura 6 presenta un ejemplo del perfil de N-glicanos de proteínas totales con la muestra LTX 100 no concentrada (figura 6a), la muestra concentrada con el filtro de 10 kDa (figura 6b) y los dos controles, el filtrado después de la etapa de concentración de la muestra de LTX 100 (figura 6c) y la muestra de blanco que es el líquido de conservación (figura 6d).

No se observó ningún pico alto (es decir, 20-26 para NA2) en el blanco (líquido de conservación). Los filtrados presentaban un pico alto en el valor base (es decir, 0-35 para NA2), lo que explica que no haya ninguna pérdida significativa de proteína durante el procedimiento de concentración. La dilución 1/125 reducía la señal en comparación con la placa inicial atenuada. El uso de la concentración de APTS más alta de 20 mM a 200 mM aumentó la señal de intensidad de fluorescencia (desde el ensayo 2 previo: el NA2 era 121 antes y 292 después de la etapa de concentración).

Referencias

- Shaw, B. W., Gordon, R. D., Iwatsuki, S. y Starzl, T. E. *Hepatic Retransplantation. Transplant. Proc.* 17, 264-271 (1985).
- Oh, C.-K., Sawyer, R. G., Pelletier, S. J., Pruett, T. L. y Sanfey, H. A. Independent predictors for primary non-function after liver transplantation. *Yonsei Med. J.* 45, 1155-61 (2004).

3. Feng, S. et al. Characteristics associated with liver graft failure: the concept of a donor risk index. *Am. J. Transplant* 6, 783-90 (2006).
4. Braat, A. E. et al. The Eurotransplant donor risk index in liver transplantation: ET-DRI. *Am. J. Transplant* 12, 2789-96 (2012).
- 5 5. Devlin, J. et al. Relationship between early liver graft viability and enzyme activities in effluent preservation solution. *Transplantation* 60, 627-31 (1995).
6. Bronsther, O. L. et al. Effluent levels of hyaluronic acid can predict ultimate graft outcome after clinical liver transplantation: a prospective series. *Transplant. Proc.* 25, 1538-40 (1993).
- 10 7. Verhoeven, C. J. et al. Biomarkers to assess graft quality during conventional and machine preservation in liver transplantation. *J. Hepatol.* 61, 672-84 (2014).
8. Monbaliu, D. y Brassil, J. Machine perfusion of the liver: past, present and future. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 15, 160-6 (2010).
9. Callewaert, N. et al. Total serum protein N-glycome profiling on a capillary electrophoresis-microfluidics platform. *Electrophoresis* 25, 3128-3131 (2004).
- 15 10. Callewaert, N. et al. Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics. *Nat. Med.* 10, 429-34 (2004).
11. Vanderschaeghe, D. et al. GlycoFibroTest is a highly performant liver fibrosis biomarker derived from DNA sequencer-based serum protein glycomics. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 986-94 (2009).
- 20 12. Blomme, B. et al. N-glycan based biomarker distinguishing non-alcoholic steatohepatitis from steatosis independently of fibrosis. *Dig. Liver Dis.* 44, 315-22 (2012).
13. Blomme, B. et al. Serum protein N-glycosylation in paediatric non-alcoholic fatty liver disease. *Pediatr. Obes.* 7, 165-73 (2012).
14. Verhelst X, Blomme B, Geerts A, Colle I, Troisi RI, Rogiers X, Callewaert N, V. V. H. Glycomics as a new tool for preservation fluid analysis in liver transplantation. en *Acta Gastroenterologica Belgica* A25 (2013).
- 25 15. Laroy, W., Contreras, R. y Callewaert, N. Glycome mapping on DNA sequencing equipment. *Nat. Protoc.* 1, 397-405 (2006).
16. Quinlan, J. in (Morgan Kaufman, 1993).
17. Vermassen, T. et al. Urinary prostate protein glycosylation profiling as a diagnostic biomarker for prostate cancer. *Prostate* 75, 314-22 (2015).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para predecir la aparición de falta de función primaria de un injerto de hígado, que comprende:
 - recoger un perfundido de un hígado obtenido de un donante, y
 - determinar la abundancia relativa del oligosacárido N-glicano asialo-agalacto-fucosilado biantenarico (NGA2F) y/o el oligosacárido N-glicano núcleo- α -1,6-fucosilado bisecante biantenarico, agalactosilado (NGA2FB) y/o el oligosacárido N-glicano núcleo- α -1,6-fucosilado biantenarico, monogalactosilado (NG1A2F) en dicho perfundido,en donde una cantidad significativamente mayor de NGA2F y/o NGA2FB y/o NG1A2F en comparación con la cantidad respectivamente de NGA2F y/o NGA2FB y/o NG1A2F en un perfundido recogido de un hígado de control, es predictivo de la aparición de falta de función primaria del injerto de hígado.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha determinación de la abundancia (relativa) de NGA2F, NGA2FB y NG1A2F en dicho perfundido se lleva a cabo por electroforesis capilar.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha electroforesis capilar es electroforesis capilar asistida por fluoróforos asistida por secuenciador de ADN.
4. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 2-3, en donde dicha electroforesis capilar se lleva a cabo en los N-glicanos que son liberados de proteínas presentes en dicho perfundido y que posteriormente se derivatizan.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha derivatización comprende marcaje de dichos N-glicanos con ácido 8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico y/o desialilación.
6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho hígado de control es un hígado que después de trasplante no da como resultado la aparición de falta de función primaria.
7. Uso de los N-glicanos NGA2F, NGA2FB y/o NG1A2F para predecir la aparición de falta de función primaria de un injerto de hígado en un perfundido de dicho hígado.
8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho perfundido de dicho hígado se concentra antes de determinar dicha abundancia relativa de dichos N-glicanos.

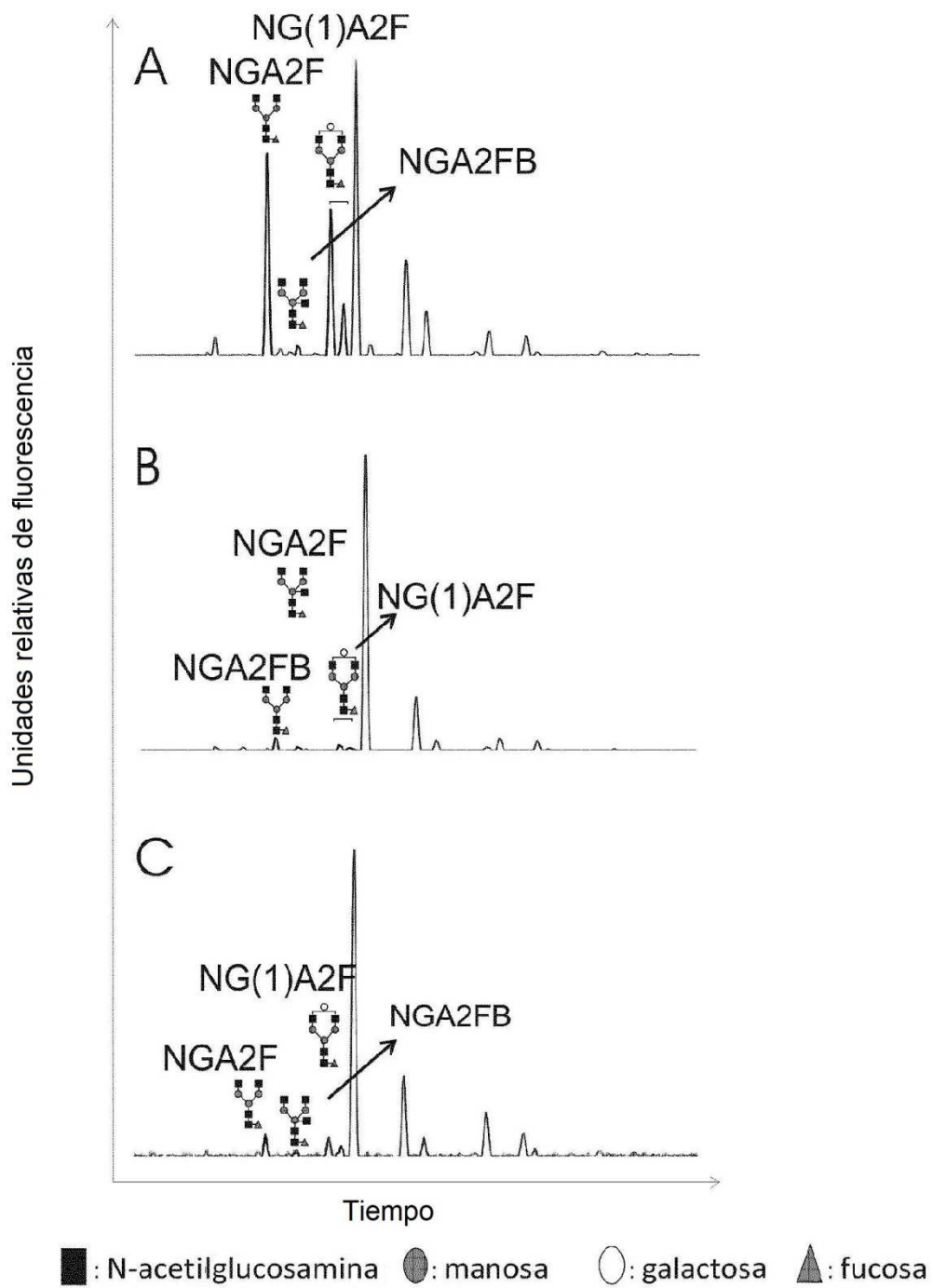


FIG. 1

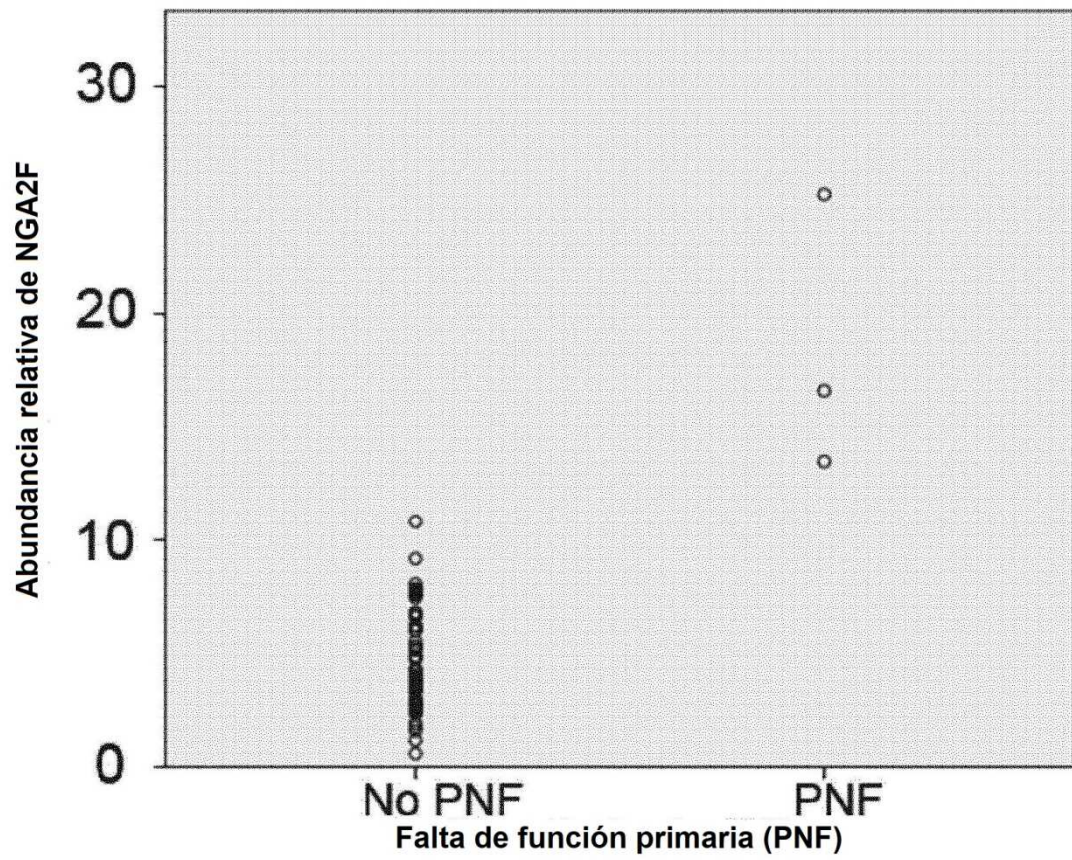


FIG. 2

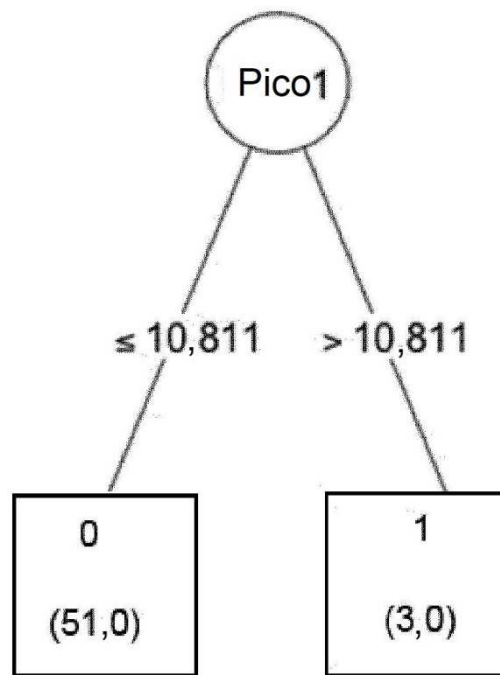


FIG. 3

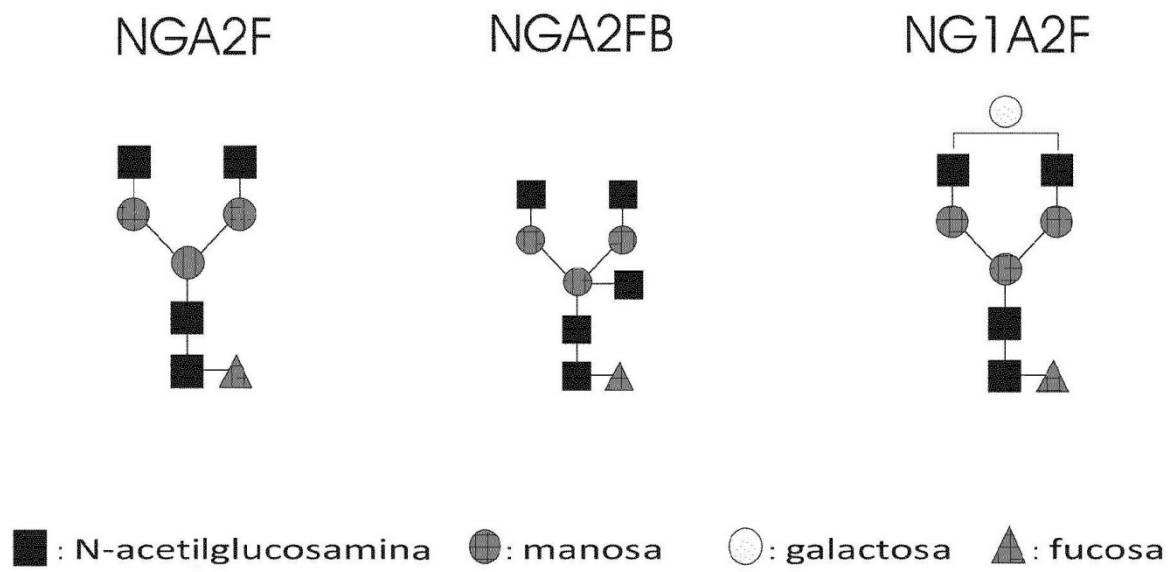


FIG. 4

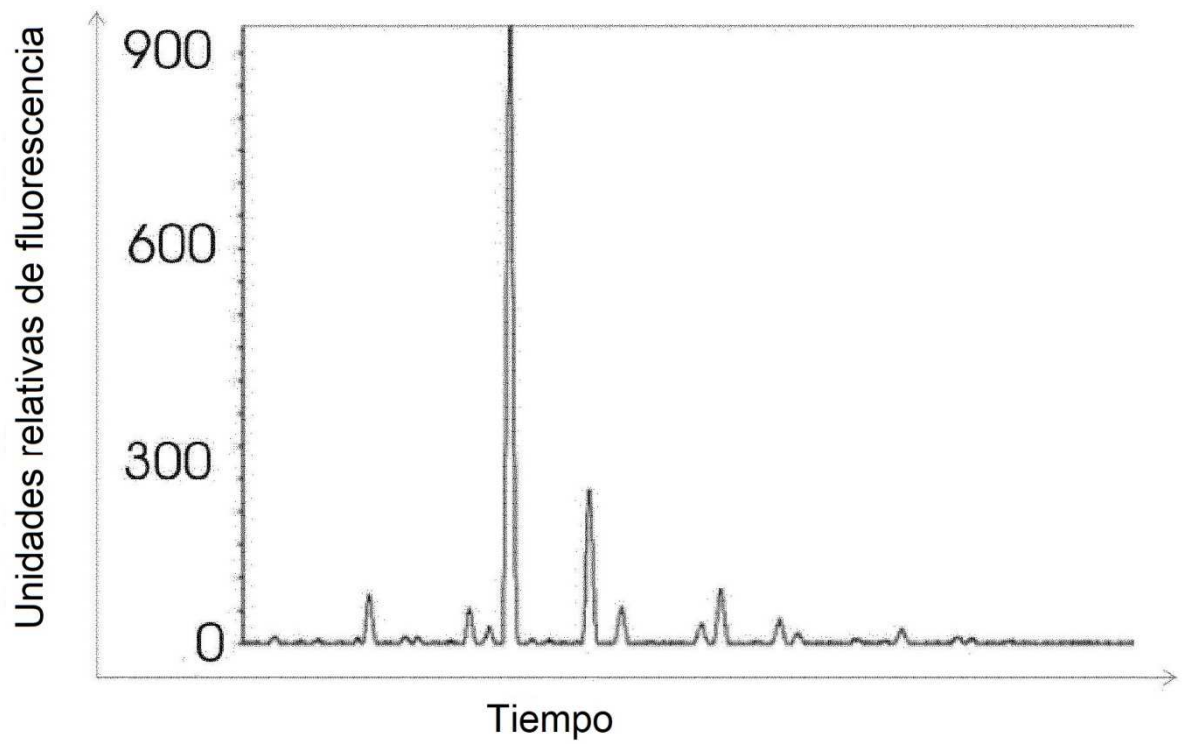


FIG. 5a

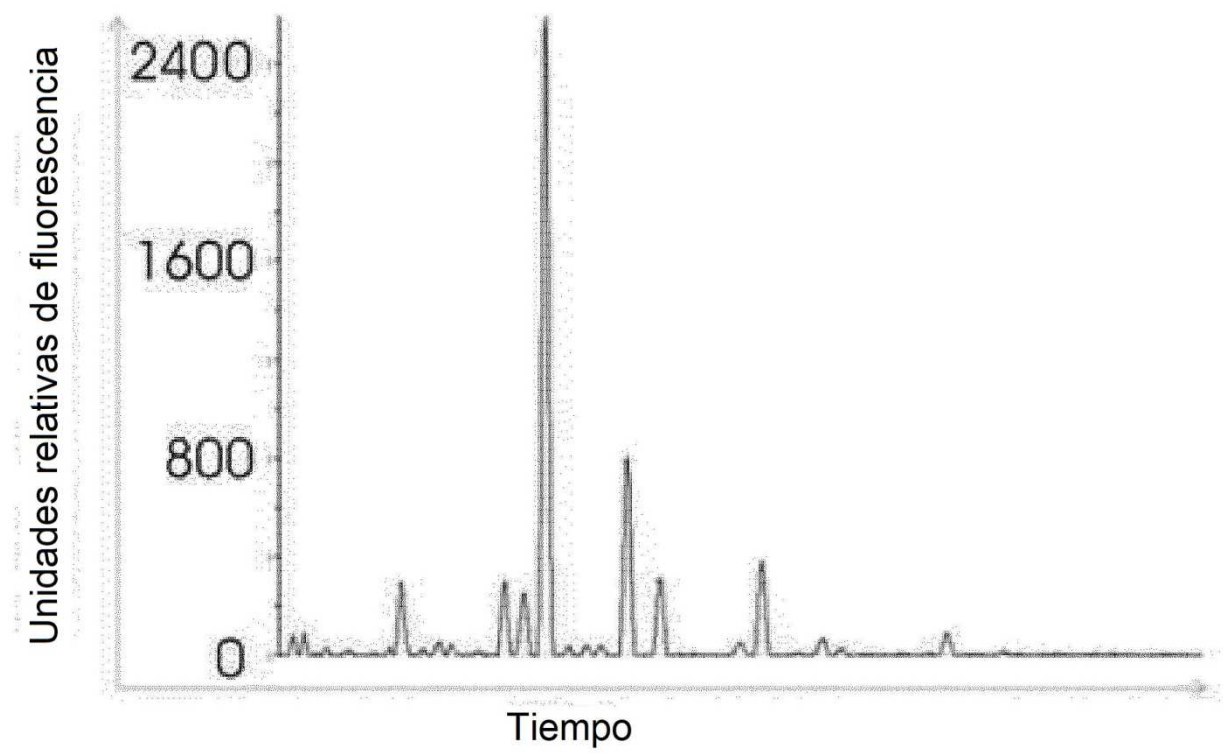


FIG. 5b

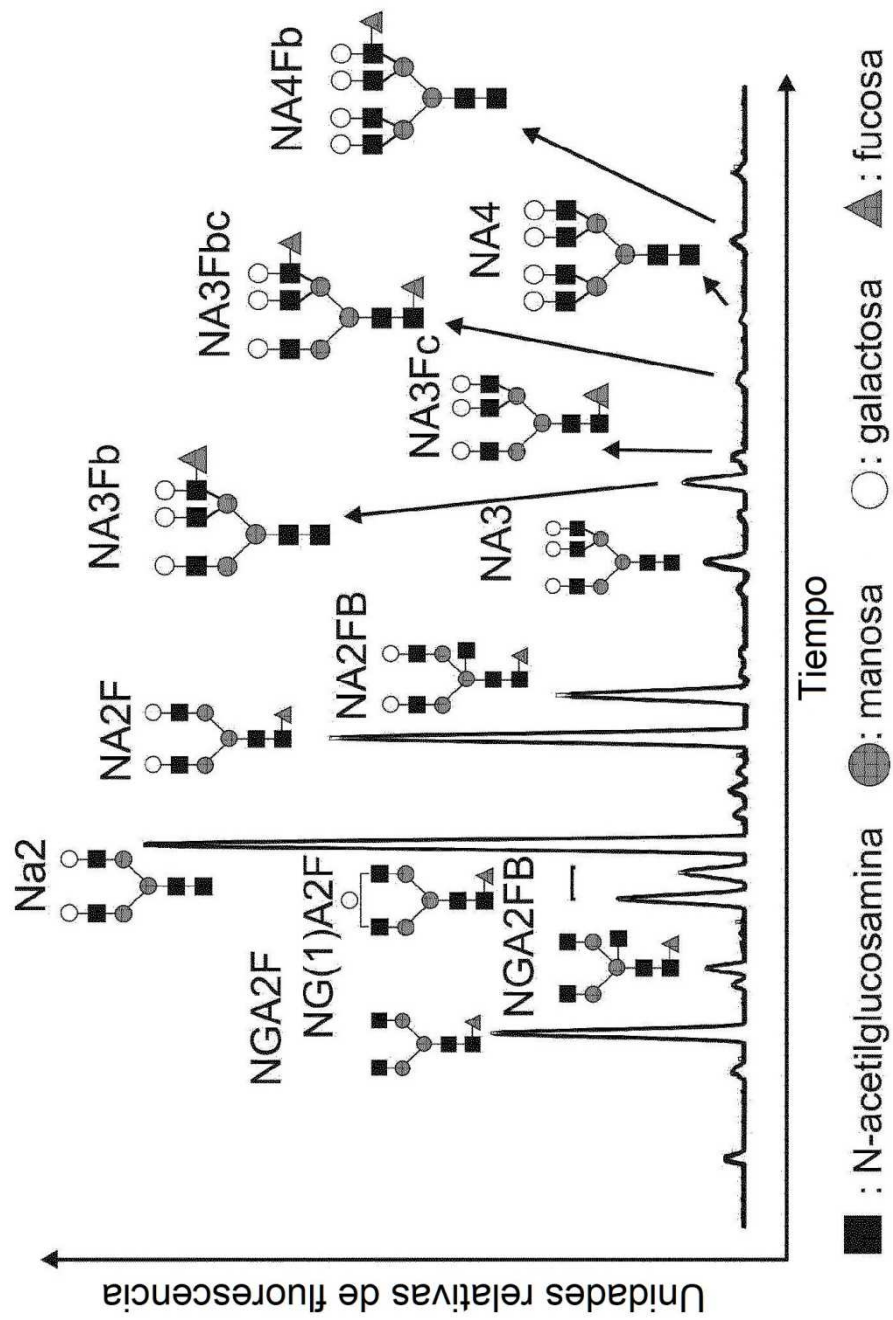


FIG.5c

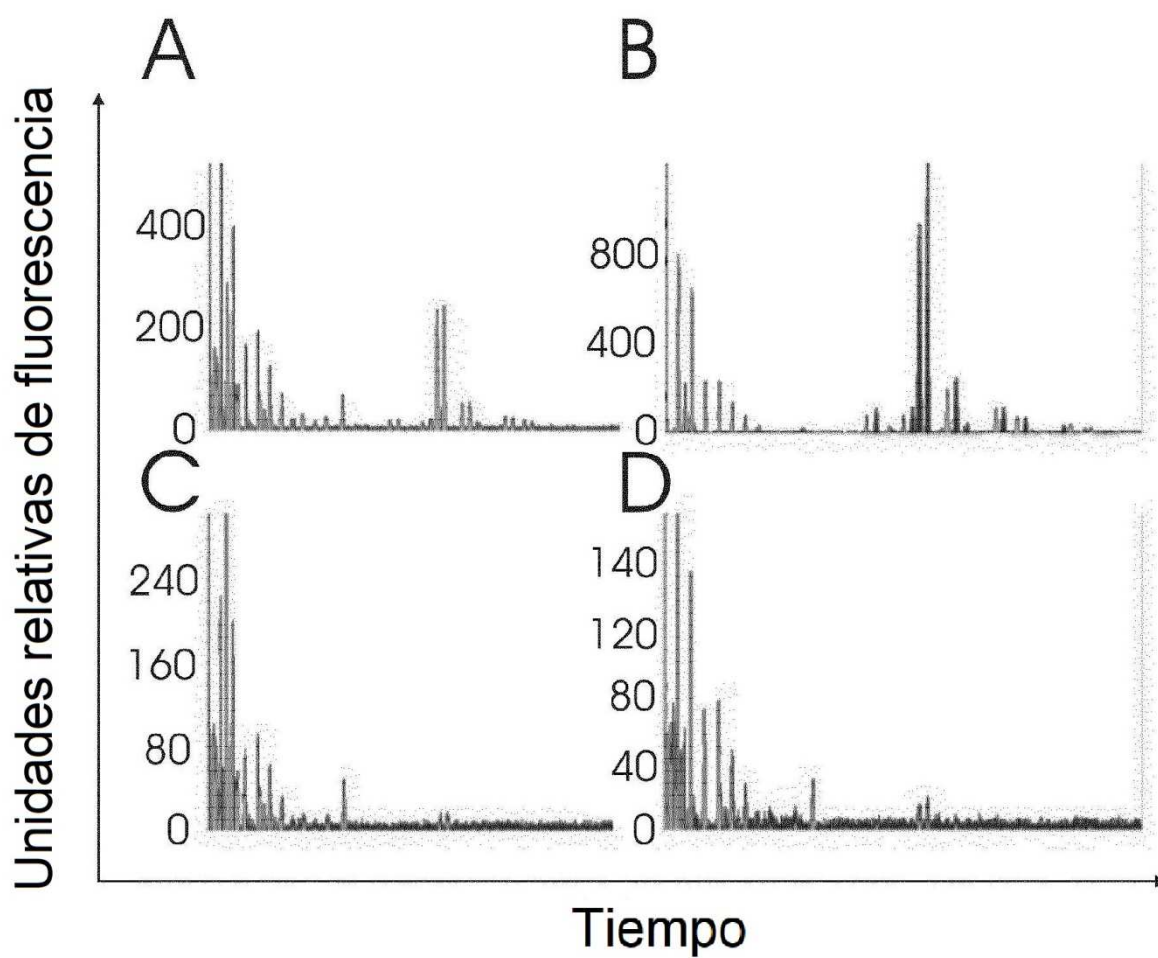


FIG. 6

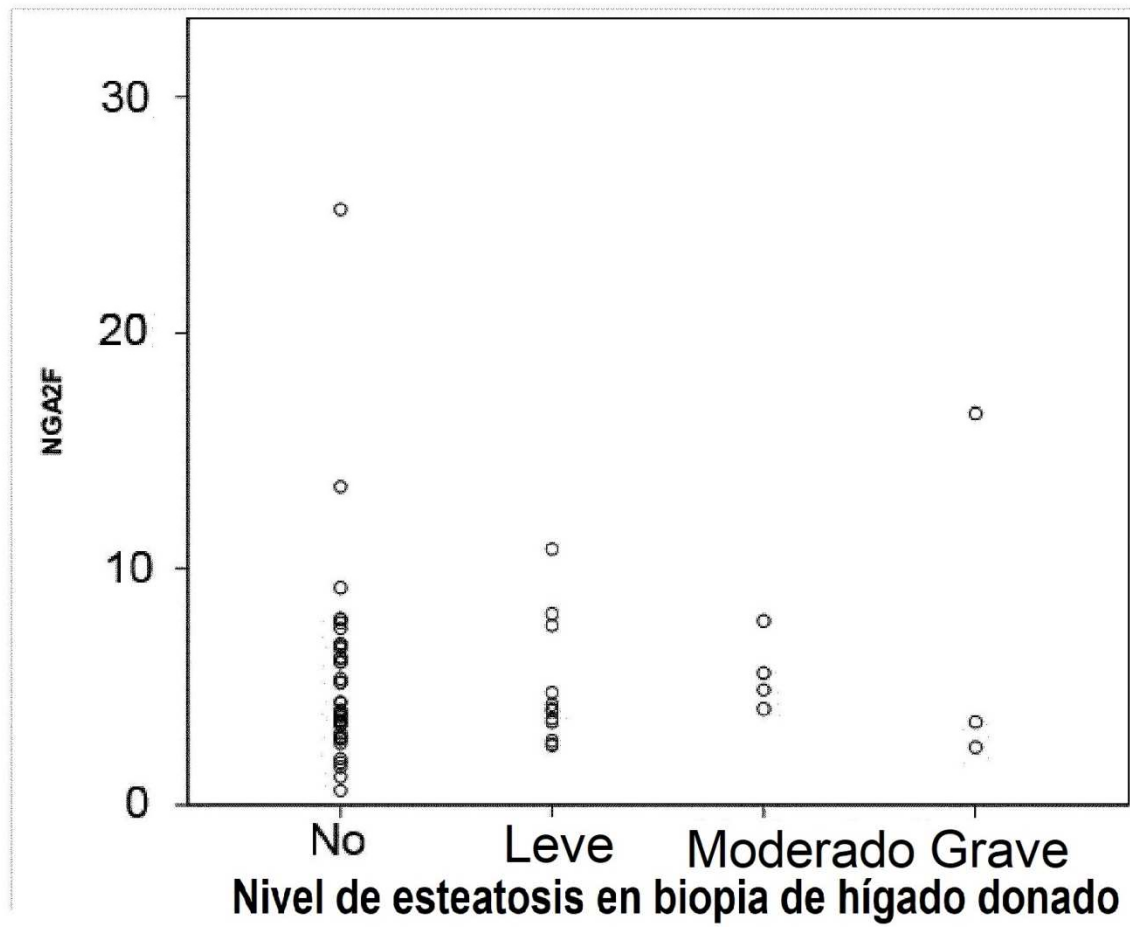


FIG. 7