

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 322**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2015 PCT/EP2015/080423**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16097259**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015 E 15817252 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3234599**

54 Título: **Métodos de predicción de alteraciones de injerto**

30 Prioridad:

**19.12.2014 EP 14307111**

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

**09.10.2020**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
UNIVERSITÉ DE NANTES (33.3%) y  
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NANTES (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BROUARD, SOPHIE;  
GIRAL, MAGALI y  
DANGER, RICHARD**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 786 322 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**

Métodos de predicción de alteraciones de injerto

Campo de la invención:

5 La invención se refiere al campo de la medicina, y más particularmente a la predicción de alteraciones del injerto (por ejemplo, en pacientes trasplantados de riñón).

Antecedentes de la invención:

10 El análisis histológico es una herramienta útil en la detección y diagnóstico de lesiones de aloinjerto renal y se realizan regularmente biopsias de vigilancia de un año<sup>1</sup>. Sin embargo, indican que las alteraciones del injerto ya establecidas y los biomarcadores establecidos anteriormente, particularmente a partir de procedimientos no invasivos con menos riesgo de complicaciones, proporcionarían a los médicos medios adicionales para ajustar mejor la atención al paciente lo antes posible.

15 La fibrosis intersticial y la atrofia tubular (IFTA) es una característica histológica común sin una etiología específica que se ha relacionado con el deterioro progresivo de la función renal y la disminución de la supervivencia del injerto<sup>2</sup>. Además, se ha demostrado que la presencia de fibrosis e inflamación se asocia con una reducción de la función del injerto y la supervivencia<sup>3-5</sup> ya en las biopsias de protocolo de 1 año<sup>6</sup>, lo que refuerza la necesidad de biomarcadores anteriores.

20 Mediante el uso de micromatrices de genes, varios grupos informaron que es posible identificar modulaciones genéticas en biopsias ya a los 3 meses después del trasplante<sup>7, 8</sup>. Sin embargo, la biopsia es invasiva y está sujeta a complicaciones y errores de muestreo, y los análisis histológicos pueden exhibir variabilidad significativa en la interpretación<sup>9, 10</sup>. Se ha demostrado que la sangre es un compartimento útil para observar la modificación de la expresión génica asociada con alteraciones del injerto dentro de un contexto de rechazo agudo del aloinjerto renal<sup>11, 12</sup>, pero patrones de fenotipo sanguíneo y/o expresión génica a los 3 meses después del trasplante nunca se ha estudiado ni sugerido como útil para la predicción de las características histológicas de las biopsias de vigilancia de 12 meses.

25 Sin embargo, sería muy útil tener un método para predecir, sin ninguna modificación previa del tratamiento inmunosupresor, las alteraciones del injerto y el eventual rechazo posterior del injerto. Si bien los médicos usan parámetros biológicos bien conocidos para evaluar la función renal (concentraciones séricas de creatinina y urea y aclaramiento), estos parámetros no son suficientes para un diagnóstico preciso de tolerancia o rechazo y, lo que es más importante, tienen valores predictivos pobres. Actualmente, solo una biopsia del riñón injertado permite, mediante el análisis de la presencia o ausencia de varios tipos de lesiones histológicas, la evaluación precisa de dicha funcionalidad del riñón injertado. Sin embargo, una biopsia es un examen invasivo, que no está exento de peligro para el órgano injertado y, de este modo, generalmente no se realiza en pacientes trasplantados que tienen valores de parámetros biológicos estables. Además, la variabilidad del diagnóstico, debido a la subjetividad del análisis, es un inconveniente del examen histológico de las biopsias. De este modo, se necesita un método no invasivo, preciso y confiable de predicción de las alteraciones/lesiones del injerto.

40 Además, en el caso de muchos órganos injertados, cuando los valores de los parámetros biológicos estándar permiten el diagnóstico de la alteración del injerto, el procedimiento ya está en progreso y, aunque en algunos casos puede detenerse, las alteraciones que han sido inducidos generalmente no se pueden revertir. Además, para establecer el diagnóstico, generalmente se realiza una biopsia del órgano injertado, que, como se dijo anteriormente, no está exento de peligro. De este modo, también sería muy valioso contar con un método no invasivo que permita determinar si los pacientes trasplantados están en riesgo de deterioro de la función del órgano en las primeras etapas del procedimiento, lo que permitiría adaptar el tratamiento inmunosupresor y, en algunos casos, podría prevenir el procedimiento de rechazo crónico.

Resumen de la invención:

45 En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* de predicción de alteraciones del injerto en un paciente trasplantado de riñón, que comprende una etapa de determinación del nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en genes de la proteína bactericida/aumento de la permeabilidad (BPI), ligando 1 de la quimiocina (motivo C) (XCL1) y 3 que contiene el dominio de tiorredoxina (TXNDC3) en una muestra biológica obtenida de dicho paciente trasplantado.

50 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un kit apropiado para realizar los métodos de la invención, en el que dicho kit comprende reactivos para medir los niveles de expresión de los genes de BPI, XCL1 y TXNDC3.

En un tercer aspecto, la invención se refiere al uso de un kit que comprende reactivos para medir los niveles de expresión de los genes de BPI, XCL1 y TXNDC3 para realizar los métodos de la invención.

Se describe también un método para ajustar el tratamiento inmunosupresor administrado a un receptor trasplantado después de su trasplante, que comprende las siguientes etapas de: (i) realizar los métodos de predicción de alteraciones del injerto en un paciente trasplantado de la invención, y (ii) ajustar el tratamiento inmunosupresor.

Descripción detallada de la invención:

- 5 La invención aborda estas necesidades, ya que se refiere a métodos útiles en la predicción temprana del desarrollo y la progresión de las alteraciones del injerto.

10 Los inventores efectivamente analizaron el perfil del gen y el fenotipo celular de una cohorte prospectiva de 79 primeros receptores renales separados en 4 grupos según la biopsia de vigilancia de un año: sin lesión (histología normal; NL); IFTA aislada; IFTA con infiltrado inflamatorio aislado solo dentro del compartimento marcado (i-atr > 0) (i-IFTA); y características de la lesión aloimmune (ALLO). Mediante un estudio que realizó micromatrices de expresión génica y fenotipo celular realizado en células mononucleares de sangre a los 3 meses después del trasplante para estos 79 pacientes con trasplante renal, los inventores demostraron que la expresión de genes sanguíneos puede discriminar a los pacientes con biopsia normal de 1 año a través de una asociación de solo 3 genes con un área bajo una curva ROC de 0.76 después de la validación de remuestreo bootstrap.

15 Los resultados actuales sugieren que la expresión de genes sanguíneos muy temprano después del trasplante puede predecir la alteración histológica anormal del injerto al año, para todas las categorías de alteración (IFTA, i-IFTA y ALLO) en comparación con la histología normal. De acuerdo con lo anterior, los inventores han demostrado que la expresión de genes sanguíneos a los tres meses después del trasplante puede predecir la alteración del injerto al año. Esta firma temprana mínimamente invasiva puede mejorar nuestra comprensión de la lesión del injerto y podría ser útil para el diagnóstico temprano y el ajuste de la terapia antes de la lesión del injerto.

Definiciones:

En toda la especificación, se emplean varios términos y se definen en los siguientes párrafos.

25 Como se usa en este documento, el término "gen de proteína bactericida/que aumenta la permeabilidad (BPI)" codifica una proteína de unión a lipopolisacárido de 456 aminoácidos que forma parte del sistema inmune innato (Entrada gen ID No. 671). Se asocia con gránulos de neutrófilos humanos y tiene actividad bactericida en organismos gramnegativos. El término incluye BPI natural y variantes del mismo. La proteína BPI humana natural tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el número de acceso UniProt P17213 y está codificada por la secuencia de ácido nucleico proporcionada en la base de datos GenBank con el número de acceso NM\_001725.

30 Como se usa en este documento, el término "gen del ligando 1 de la quimiocina (motivo C) (XCL1)" codifica una pequeña citocina de 114 aminoácidos que pertenecen a la familia de quimiocinas XC que también se conoce como linfotactina (Entrada gen ID No. 6375). El término incluye XCL1 de origen natural y variantes del mismo. La proteína XCL1 humana de origen natural tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el número de acceso UniProt P47992 y está codificada por la secuencia de ácido nucleico proporcionada en la base de datos GenBank con el número de acceso NM\_002995.

35 Como se usa en este documento, el término "dominio de tiorredoxina que contiene el gen 3 (TXNDC3)" codifica una proteína de 588 aminoácidos también conocida como tiorredoxina-2 específica de espermátida (Sptrx-2) con un dominio de tiorredoxina N-terminal y tres dominios de nucleósido difosfato quinasa (NDK) C-terminal (Entrada gen ID No. 51314). El término incluye TXNDC3 de origen natural y variantes del mismo. La proteína TXNDC3 humana de origen natural tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en el número de acceso UniProt Q8N427 y está codificada por la secuencia de ácido nucleico proporcionada en la base de datos GenBank con el número de acceso NM\_016616.

45 Como se usa en este documento, el término "gen" se refiere a una secuencia de ADN que codifica o corresponde a una secuencia particular de aminoácidos que comprende la totalidad o parte de una o más proteínas o enzimas, y puede o no incluir secuencias de ADN reguladoras, tales como secuencias promotoras, que determinan, por ejemplo, las condiciones bajo las cuales se expresa el gen. Algunos genes, que no son genes estructurales, se pueden transcribir de ADN a ARN, pero no se traducen en una secuencia de aminoácidos. Otros genes pueden funcionar como reguladores de genes estructurales o como reguladores de la transcripción de ADN. En particular, el término gen puede estar destinado a la secuencia genómica que codifica una proteína, esto es, una secuencia que comprende secuencias reguladoras, promotoras, intrón y exón.

50 Una "secuencia codificante" o una secuencia "que codifica" un producto de expresión, tal como un ARN, polipéptido, proteína o enzima, es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, polipéptido, proteína o enzima, esto es, la secuencia de nucleótidos codifica una secuencia de aminoácidos para ese polipéptido, proteína o enzima. Una secuencia de codificación para una proteína puede incluir un codón de inicio (generalmente ATG) y un codón de parada.

55 Como se usa en este documento, "determinar" abarca la detección o cuantificación. De hecho, un nivel de expresión puede ser cualitativo o cuantitativo. De este modo, una determinación de si un polinucleótido o polipéptido está

presente o ausente (por ejemplo, detectable o indetectable) constituye determinar su nivel de expresión en diversas realizaciones, mientras que en otras realizaciones, se determina un nivel cuantitativo. Una sola medición puede proporcionar información sobre el nivel de expresión, actividad o ambos. De este modo, evaluar el nivel de expresión de una proteína incluye evaluar uno o más parámetros o características que proporcionan información sobre el nivel de expresión de la proteína, la actividad de la proteína o ambos.

Como se usa en este documento, "detectar" significa determinar si BPI, XCL1 y/o TXNDC3 está presente o no en una muestra biológica y "cuantificar" significa determinar la cantidad de BPI, XCL1 y/o TXNDC3 en una muestra biológica.

Como se usa en este documento, el término "nivel de referencia predeterminado" se refiere a los niveles de expresión de los genes de BPI, XCL1 y TXNDC3 en muestras biológicas obtenidas de la población general o de una población seleccionada de sujetos. Por ejemplo, la población seleccionada puede estar compuesta por un paciente trasplantado aparentemente sano, tal como individuos que no han tenido previamente ningún signo o síntoma que indique la presencia de alteraciones del injerto y/o el resultado de un rechazo del injerto. Se puede determinar un "nivel de referencia predeterminado", por ejemplo, determinando el nivel de expresión de ácidos nucleicos de BPI, XCL1 y TXNDC3 o polipéptidos codificados, en una muestra biológica correspondiente obtenida de uno o más sujetos de control (por ejemplo, no sufren por alteración del injerto y/o rechazo del injerto o se sabe que no es susceptible a dicha enfermedad). Cuando se usa dicho nivel de referencia predeterminado, un nivel inferior o disminuido determinado en una muestra biológica (esto es, una muestra de prueba obtenida del sujeto) es indicativo, por ejemplo, de que dicho paciente está en riesgo de sufrir alteraciones y/o rechazo del injerto. El nivel de referencia predeterminado se puede establecer en base a mediciones comparativas entre pacientes aparentemente sanos (por ejemplo, pacientes clasificados con biopsia normal) y pacientes con alteraciones del injerto establecidas (incluyendo IFTA, IFTA inflamatoria y ALLO) y/o rechazo del injerto (incluyendo rechazo mediado por las células T crónicas (c-TCMR) o rechazo mediado por anticuerpos crónicos (c-ABMR)).

Como se usa en este documento, un nivel "inferior" o "disminuido" se refiere a un nivel de expresión en una muestra biológica (esto es, muestra de sangre obtenida del sujeto) que es al menos un 20% más baja, en una realización al menos un 30% más baja, en una realización adicional al menos un 40% más baja; en una realización adicional al menos un 50% más baja, en una realización adicional al menos un 100% más baja (esto es, 2 veces), en una realización adicional al menos un 200% más baja (esto es, 3 veces), en una realización adicional al menos 300% más baja (esto es, 4 veces), en relación con el nivel de referencia predeterminado (por ejemplo, muestra biológica obtenida de uno o más pacientes sanos de control (s)).

Como se usa en este documento, el término "muestra biológica" se refiere a una muestra biológica obtenida con el propósito de evaluación *in vitro*. En los métodos de la invención, la muestra biológica puede comprender cualquier fluido corporal obtenido de un paciente. Las muestras biológicas típicas que se usarán en el método según la invención son muestras de sangre (por ejemplo, muestra de sangre completa, muestra de suero o muestra de plasma) y muestras de orina. Una muestra biológica puede ser pretratada o procesada opcionalmente antes de ser usada. Los ejemplos de etapas de pretratamiento incluyen la adición de un reactivo tal como un estabilizador, un conservante, un fijador, un reactivo de lisis, un diluyente, un reactivo antiapoptótico, un reactivo regulador, un reactivo regulador de la osmolaridad, un reactivo regulador del pH, y/o un reactivo de reticulación. De este modo, una muestra biológica se puede analizar bajo cualquiera de los métodos y sistemas en este documento en 1 semana, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, 1 día, 12 horas, 6 horas, 3 horas, 2 horas, o 1 hora desde el momento en que se obtiene la muestra biológica.

El término "trasplante" y las variaciones del mismo se refieren a la inserción de un trasplante (también llamado injerto) en un receptor, ya sea que el trasplante sea singénico (donde el donante y el receptor son genéticamente idénticos), alogénico (donde el donante y el receptor son de diferentes orígenes genéticos pero de la misma especie), o xenogénicas (donde el donante y el receptor son de diferentes especies). De este modo, en un escenario típico, el huésped es humano y el injerto es un isoinjerto, derivado de un ser humano del mismo o diferente origen genético. En otro escenario, el injerto se deriva de una especie diferente de la que se trasplanta, incluidos los animales de especies filogenéticamente ampliamente separadas.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* de predicción de alteraciones del injerto en un paciente trasplantado, que comprende una etapa de determinación del nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en genes de la proteína bactericida/que aumenta la permeabilidad (BPI), ligando 1 de la quimiocina (motivo C) (XCL1) y 3 que contiene el dominio de tiorredoxina (TXNDC3) en una muestra biológica obtenida de dicho paciente trasplantado.

Como se usa en este documento, el término "alteraciones del injerto" se refiere a características histológicas según la clasificación actualizada de Banff 2009 y podría estar relacionado o no con el deterioro progresivo de la función del injerto y la supervivencia. Este término incluye fibrosis intersticial y atrofia tubular (IFTA), IFTA inflamatoria y lesiones aloinmunes (ALLO) que acumulan cambios límite, rechazo mediado por células T agudo o crónico y rechazo mediado por anticuerpos agudo o crónico (c-ABMR).

En una realización, la invención se refiere a un método *in vitro* de predicción de alteraciones del injerto en un paciente trasplantado, que comprende una etapa de determinación de los niveles de expresión de genes de BPI y XCL1 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente trasplantado.

5 En otra realización, la invención se refiere a un método *in vitro* de predicción de alteraciones de injerto en un paciente trasplantado, que comprende una etapa de determinación de los niveles de expresión de genes de BPI y TXNDC3 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente trasplantado.

En otra realización, la invención se refiere a un método *in vitro* de predicción de alteraciones de injerto en un paciente trasplantado, que comprende una etapa de determinación de los niveles de expresión de genes XCL1 y TXNDC3 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente trasplantado.

10 En una realización preferida, la invención se refiere a un método *in vitro* de predicción de alteraciones del injerto en un paciente trasplantado, que comprende una etapa de determinación de los niveles de expresión de los genes de BPI, XCL1 y TXNDC3 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente trasplantado.

15 En una realización, dicho método comprende una etapa de (i) determinación del nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en genes de BPI, XCL1 y TXNDC3 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, y (ii) comparación de dicho nivel de expresión con el nivel de referencia predeterminado respectivo, en el que una disminución en el nivel de expresión de al menos uno de dichos genes es predictiva de alteraciones del injerto.

20 El valor de referencia predeterminado puede ser un valor umbral o un intervalo. Un valor umbral también se puede seleccionar arbitrariamente en función de las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como reconocería una persona con conocimientos ordinarios en el arte. Por ejemplo, la medición retrospectiva del nivel de expresión del miARN seleccionado en muestras de sujetos históricos almacenados adecuadamente puede usarse para establecer el valor de referencia predeterminado. El valor umbral se debe determinar para obtener la sensibilidad y especificidad óptimas según la función de la prueba y el equilibrio beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de falso positivo y falso negativo). Por lo general, la sensibilidad y especificidad óptimas (y, por lo tanto, el valor umbral) se pueden determinar usando una curva de características operativas del receptor (ROC) basada en datos experimentales. Por ejemplo, después de determinación del nivel de expresión del ARNm seleccionado en un grupo de referencia, se puede usar el análisis algorítmico para el tratamiento estadístico de los niveles de expresión determinados en las muestras que se va a analizar, y obtener de este modo un estándar de clasificación que tenga importancia para la clasificación de la muestra. El nombre completo de la curva ROC es curva característica del operador receptor, que también se conoce como curva característica de operación del receptor. Se usa principalmente para pruebas clínicas de diagnóstico bioquímico. La curva ROC es un indicador integral que refleja las variables continuas de tasa positiva verdadera (sensibilidad) y tasa positiva falsa (especificidad 1). Revela la relación entre sensibilidad y especificidad con el método de composición de imagen. Una serie de valores de corte diferentes (umbrales o valores críticos, valores límite entre los resultados normales y anormales de la prueba de diagnóstico) se establecen como variables continuas para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. Luego, la sensibilidad se usa como coordenada vertical y la especificidad se usa como coordenada horizontal para dibujar una curva. En la curva ROC, el punto más cercano a la esquina superior izquierda del diagrama de coordenadas es un punto crítico que tiene valores de alta sensibilidad y especificidad alta. Este método algorítmico se realiza preferiblemente con un ordenador. El software o los sistemas existentes en la técnica se pueden usar para dibujar la curva ROC, tales como: software estadístico médico MedCalc 9.2.0.1, SPSS 9.0, ROCPOWER.SAS, DESIGNROC.FOR, MULTIREADER POWER.SAS, CREATEROC. SAS, GB STAT V10.0 (Dynamic Microsystems, Inc. Silver Spring, Md., USA), etc.

En una realización, la muestra biológica es una muestra de sangre (por ejemplo, muestra de sangre completa, muestra de suero o muestra de plasma) o una muestra de orina.

45 En una realización preferida, la muestra biológica es una muestra de sangre.

En una realización, la muestra biológica se obtiene 1 mes después del trasplante, 2 meses después del trasplante, 3 meses después del trasplante, 4 meses después del trasplante, 5 meses después del trasplante o 6 meses después del trasplante.

50 En una realización particular, la muestra biológica es una muestra de sangre obtenida 3 meses después del trasplante.

En el contexto del trasplante, se prevé que las alteraciones de los trasplantes no renales también se predecirían usando los biomarcadores de la invención. De acuerdo con lo anterior, la invención también abarca diversos tipos de trasplantes que incluyen, pero no se limitan a, un aloinjerto renal, un trasplante de corazón, un aloinjerto de pulmón, un aloinjerto de hígado o un aloinjerto de páncreas.

55 En una realización, el paciente trasplantado es un paciente renal trasplantado.

5 En una realización, dicho método comprende una etapa de (i) determinación del nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes de BPI, XCL1 y TXNDC3 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, y (ii) comparación de dicho nivel de expresión con el nivel de referencia predeterminado respectivo, en el que una disminución en el nivel de expresión de al menos uno de dichos genes es predictiva de alteraciones del injerto.

El valor de referencia predeterminado puede ser un valor umbral o un intervalo como se describió anteriormente.

10 En el contexto del trasplante, se prevé que las alteraciones de los trasplantes no renales también se predecirían usando los biomarcadores de la invención. De acuerdo con lo anterior, la invención también abarca diversos tipos de trasplantes que incluyen, pero no se limitan a, un aloinjerto renal, un trasplante de corazón, un aloinjerto de pulmón, un aloinjerto de hígado o un aloinjerto de páncreas.

En una realización, el paciente trasplantado es un paciente renal trasplantado.

En una realización, la muestra biológica es una muestra de sangre (por ejemplo, muestra de sangre completa, muestra de suero o muestra de plasma) o una muestra de orina.

15 En una realización, la muestra biológica es una muestra de sangre (por ejemplo, muestra de sangre completa, muestra de suero o muestra de plasma) o una muestra de orina.

En una realización, la muestra biológica se obtiene 1 mes después del trasplante, 2 meses después del trasplante, 3 meses después del trasplante, 4 meses después del trasplante, 5 meses después del trasplante o 6 meses después del trasplante.

20 En una realización particular, la muestra biológica es una muestra de sangre obtenida 3 meses después del trasplante.

Métodos de determinación del nivel de expresión de los biomarcadores de la invención:

25 La determinación del nivel de expresión del gen de los genes de BPI, XCL1 y/o TXNDC3 se puede realizar mediante una variedad de técnicas. Generalmente, el nivel de expresión determinado es un nivel de expresión relativo. Por ejemplo, la determinación comprende poner en contacto la muestra biológica con reactivos selectivos tales como sondas o ligandos, y detectar así la presencia, o medir la cantidad, de ácidos nucleicos o polipéptidos de interés originalmente en dicha muestra biológica. El contacto se puede realizar en cualquier dispositivo apropiado, tal como una placa, plato de microtitulación, tubo de ensayo, pocillo, vidrio, columna, etc. En realizaciones específicas, el contacto se realiza en un sustrato recubierto con el reactivo, tal como una matriz de ácido nucleico o una matriz de ligando específica. El sustrato puede ser un sustrato sólido o semisólido tal como cualquier soporte apropiado que comprende vidrio, plástico, nylon, papel, metal, polímeros y similares. El sustrato puede ser de diversas formas y tamaños, tal como un portaobjetos, una membrana, una cuenta, una columna, un gel, etc. El contacto se puede realizar en cualquier condición apropiada para un complejo detectable, tal como un híbrido de ácido nucleico o un complejo anticuerpo-antígeno, que se formará entre el reactivo y los ácidos nucleicos o polipéptidos de la muestra biológica.

35 En una realización particular, el nivel de expresión de los genes de BPI, XCL1 y/o TXNDC3 se puede determinar determinando la cantidad de ARNm.

40 Los métodos de determinación de la cantidad de ARNm son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en las muestras biológicas (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de una muestra de sangre obtenida del paciente) se extrae primero según métodos estándar, por ejemplo usando enzimas líticas o soluciones químicas o extraído por resinas de unión ácido nucleico siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído se detecta luego por hibridación (por ejemplo, análisis de transferencia Northern) y/o amplificación (por ejemplo, RT-PCR). Se prefiere RTPCR cuantitativo o semicuantitativo. La RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa en tiempo real es particularmente ventajosa.

45 Los ácidos nucleicos que tienen al menos 10 nucleótidos y exhiben complementariedad de secuencia u homología con el ARNm de interés en este documento encuentran utilidad como sondas de hibridación. Se entiende que tales ácidos nucleicos no necesitan ser idénticos, pero por lo general son al menos aproximadamente 80% idénticos a la región homóloga de tamaño comparable, más preferiblemente 85% idénticos e incluso más preferiblemente 90-95% idénticos. Las sondas comprenden por lo general ácidos nucleicos monocatenarios de entre 10 y 1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo de entre 10 y 800, más preferiblemente de entre 15 y 700, por lo general de entre 20 y 500.

50 Las sondas y los cebadores son "específicos" para los ácidos nucleicos a los que hibridan, esto es, hibridan preferiblemente en condiciones de hibridación de alta rigurosidad (correspondiente a la temperatura de fusión más alta T<sub>m</sub>, por ejemplo, formamida al 50%, 5x o 6x SCC. SCC es un NaCl 0.15 M, citrato de Na 0.015 M).

55 En el contexto de la invención, la "hibridación" se refiere al hecho de obtener una estrecha interacción de la sonda de nucleótidos y la región diana que se espera que sea revelada por la detección de la sonda de nucleótidos. Dicha interacción se puede lograr mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre la sonda de nucleótidos y la

secuencia diana, lo cual es típico de las interacciones entre moléculas de nucleótidos complementarias capaces de emparejar bases. Los enlaces de hidrógeno se pueden encontrar, por ejemplo, en la hibridación de dos cadenas complementarias de ADN.

5 Será ventajoso usar ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tales como un marcador detectable, para detectar la hibridación. Se conoce una amplia variedad de indicadores apropiados en la técnica que incluyen ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros.

10 Los métodos y reactivos convencionales para aislar ARN de una muestra comprenden el kit de aislamiento de miARN High Pure (Roche), Trizol (Invitrogen), extracción de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo, kit de aislamiento de miARN PureLink™ (Invitrogen), sistema de purificación de ARN total Micro-to-Midi PureLink (Invitrogen), kit RNeasy (Qiagen), kit Oligotex (Qiagen), extracción con fenol, extracción con fenol-cloroformo, precipitación con TCA/acetona, precipitación con etanol, purificación de columna, purificación de membrana con gel de sílice, PureYield™ RNA Midiprep (Promega), PolyATtract System 1000 (Promega), Maxwell® 16 System (Promega), Aislamiento de ARN total SV (Promega), kit geneMAG-RNA/DNA (Chemicell), TRI Reagent® (Ambion), RNAqueous Kit (Ambion), ToTALLY Kit RNA™ (Ambion), kit Poly(A) Purist™ (Ambion) y cualquier otro método, comercialmente disponible o no, conocido para el experto.

20 En una realización, el nivel de expresión de uno o más ARNm se determina mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR). La QPCR se puede realizar usando productos químicos y/o máquinas de una plataforma disponible en el mercado. La QPCR se puede realizar usando máquinas QPCR desde cualquier plataforma disponible comercialmente; tal como sistema PCR Prism, geneAmp o StepOne Real Time (Applied Biosystems), LightCycler (Roche), RapidCycler (Idaho Technology), MasterCycler (Eppendorf), sistema BioMark™ HD (Fluidigm), sistema iCycler iQ, sistema Chromo 4, CFX, Sistemas MiniOpticon y Opticon (Bio-Rad), sistema SmartCycler (Cepheid), sistema RotorGene (Corbett Lifescience), sistemas MX3000 y MX3005 (Stratagene), sistema DNA Engine Opticon (Qiagen), sistemas Quantica qPCR (Techne), sistema InSyte and Syncrom cycler (BioGene), DT-322 (DNA Technology), Exicycler Notebook Thermal cycler, TL998 System (lanlong), Line-Gene-K systems (Bioer Technology), o cualquier otra plataforma disponible comercialmente. La QPCR se puede realizar usando productos químicos de cualquier otra plataforma disponible comercialmente, tal como sistema NCode EXPRESS qPCR o EXPRESS qPCR (Invitrogen), Taqman o SYBR green qPCR (Applied Biosystems), reactivos de PCR en tiempo real (Eurogentec), mezcla iTaq (Bio-Rad), mezclas y kits de qPCR (Biosense), y cualquier otro producto químico, disponible comercialmente o no, conocido para el experto. Los reactivos QPCR y el sistema de detección pueden estar basados en sondas, o pueden estar basados en quelatar un producto químico fluorescente en oligonucleótidos bicatenarios.

30 La reacción QPCR se puede realizar en un tubo; tal como un solo tubo, una tira de tubos o una placa, o se puede realizar en una tarjeta microfluídica en la que las sondas y/o cebadores relevantes ya están integrados.

35 En una realización particular, el nivel de expresión de los genes de BPI, XCL1 y/o TXNDC3 se puede determinar determinando la cantidad de proteína codificada por los genes de BPI, XCL1 y/o TXNDC3.

Tales métodos comprenden poner en contacto la muestra biológica con un socio de unión capaz de interactuar selectivamente con la proteína presente en dicha muestra. El socio de unión es generalmente un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferiblemente monoclonal.

40 Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra BPI humanos son bien conocidos para el experto en el arte, tales como los anticuerpos comercializados por Pierce Antibodies (MA1-4012).

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra XCL1 humano son bien conocidos para el experto en el arte, tales como los anticuerpos comercializados por Abnova (H00006375-M01).

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra TXNDC3 son bien conocidos para el experto en el arte, tales como los anticuerpos comercializados por Abnova (H00051314-M01).

45 Como se usa en este documento, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contiene solo una especie de sitio de combinación de anticuerpos capaz de inmunoreaccionar con un epítipo particular. De este modo, un anticuerpo monoclonal muestra por lo general una afinidad de unión única por cualquier epítipo con el que inmunoreacciona. Por lo tanto, un anticuerpo monoclonal puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpos, cada uno inmunoespecífico para un epítipo diferente, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico. Aunque históricamente se produjo un anticuerpo monoclonal mediante la inmortalización de una línea celular secretora de inmunoglobulina clonalmente pura, los métodos de la invención también pueden preparar una población monoclonalmente pura de moléculas de anticuerpo.

50 Los métodos de laboratorio de preparación de anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow et al., 1988). Los anticuerpos monoclonales (mAbs) se pueden preparar inmunizando a la proteína purificada de la invención en un mamífero, por ejemplo, un ratón, rata, humano y mamíferos similares. Las

células productoras de anticuerpos en el mamífero inmunizado se aíslan y se fusionan con células de mieloma o heteromioma para producir células híbridas (hibridoma). Las células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales se usan como fuente del anticuerpo monoclonal deseado. Este método estándar de cultivo de hibridoma se describe en Kohler and Milstein (1975).

5 Aunque los mAb se pueden producir mediante cultivo de hibridoma, la invención no debe ser tan limitada. También se contempla el uso de mAb producidos por un ácido nucleico de expresión clonado a partir de un hibridoma de esta invención. Es decir, el ácido nucleico que expresa las moléculas secretadas por un hibridoma de esta invención se puede transferir a otra línea celular para producir un transformante. El transformante es genotípicamente distinto del hibridoma original, pero también es capaz de producir moléculas de anticuerpos de esta invención, incluidos fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de anticuerpos completos, correspondientes a las secretadas por el hibridoma. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 4,642,334 de Reading; Las Publicaciones de Patentes Europeas No. 0239400 de Winter et al. y No. 0125023 de Cabilly et al.

10 También se contemplan técnicas de generación de anticuerpos que no implican inmunización, tales como, por ejemplo, usar tecnología de expresión en fagos para examinar bibliotecas naive (de animales no inmunizados); véase Barbas et al. (1992) y Waterhouse et al. (1993)

15 Como alternativa, se pueden usar agentes de unión distintos de los anticuerpos para el propósito de la invención. Estos pueden ser, por ejemplo, aptámeros, que son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos se pueden aislar mediante la evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. and Gold L., 1990. La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena SD, 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpos constreñida conformacionalmente mostrada por una proteína de plataforma, tal como la tiorredoxina A de E. coli que son seleccionadas de bibliotecas combinatorias por dos métodos híbridos (Colas et al., 1996).

20 Los socios de unión de la invención, tales como anticuerpos o aptámeros, se pueden marcar con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Los marcadores que se conocen en la técnica generalmente proporcionan (ya sea directa o indirectamente) una señal. Como se usa en este documento, el término "marcado", con respecto al anticuerpo o al aptámero, pretende abarcar el marcado directo del anticuerpo o del aptámero mediante el acoplamiento (esto es, la unión física) de una sustancia detectable, tal como un agente radiactivo o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)) al anticuerpo o aptámero, así como el marcado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con una sustancia detectable. Un anticuerpo o aptámero de la invención se puede marcar con una molécula radiactiva por cualquier método conocido en la técnica.

25 Los ensayos mencionados anteriormente por lo general implican el recubrimiento del socio de unión (esto es, anticuerpo o aptámero) en un soporte sólido. Los soportes sólidos que se pueden usar en la práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pocillos de microtitulación); cloruro de polivinilo (por ejemplo, láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, cuentas o placas de microtitulación); fluoruro de polivinilidina; papel diazotado; membranas de nylon; cuentas activadas, cuentas que responden magnéticamente y similares.

30 En otra realización de la invención, la medición de los biomarcadores en la muestra biológica se puede lograr mediante un sistema de matriz de cuentas citométricas en el que los anticuerpos que se unen a los biomarcadores se recubren directa o indirectamente en cuentas.

35 Por ejemplo, el nivel de una proteína biomarcadora tal como BPI, XCL1 y/o TXNDC3 se puede medir usando técnicas electroforéticas e inmunodiagnósticas estándar, que incluyen inmunoensayos tales como ensayos de competición, reacción directa o tipo sándwich. Dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, transferencias Western; pruebas de aglutinación; inmunoensayos mediados y marcados con enzimas, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación

40 Más particularmente, se puede usar un método ELISA, en el que los pocillos de una placa de microtitulación están recubiertos con un conjunto de anticuerpos contra BPI, XCL1 y/o TXNDC3. Luego se agrega una muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene BPI, XCL1 y/o TXNDC3 a los pocillos recubiertos. Después de un período de incubación suficiente para permitir la formación de complejos de antígeno de anticuerpo, la (s) placa (s) se puede lavar para eliminar unidades estructurales no unidos y se agrega una molécula de unión secundaria marcada de forma detectable. Se permite que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora de muestra capturada, se lava la placa y se detecta la presencia de la molécula de unión secundaria usando métodos bien conocidos en la técnica.

La medición del nivel de una proteína biomarcadora tal como BPI, XCL1 y/o TXNDC3 (con o sin métodos basados en inmunoensayo) también puede incluir la separación de las proteínas: centrifugación basada en el peso molecular de la proteína; electroforesis basada en masa y carga; HPLC basado en hidrofobicidad; cromatografía de exclusión por tamaño basada en el tamaño; y afinidad en fase sólida basada en la afinidad de la proteína por la fase sólida particular que se usa. Una vez separados, Furin o un sustrato de Furin pueden identificarse en base al conocido "perfil de separación" por ejemplo, tiempo de retención, para esa proteína y medido usando técnicas estándar.

5

Alternativamente, las proteínas separadas se pueden detectar y medir, por ejemplo, mediante un espectrómetro de masas.

Kits de la invención:

10 La invención también se refiere a un kit apropiado para realizar los métodos de la invención, en el que dicho kit comprende medios para medir los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en genes de BPI, XCL1 y TXNDC3.

En una realización, dichos medios para medir los niveles de expresión de los genes de BPI, XCL1 y TXNDC3 son cebadores y/o sondas de ácido nucleico específicos para dichos genes.

15 La invención también se refiere a reactivos, sistemas y kits de los mismos para practicar uno o más de los métodos descritos anteriormente. Los reactivos en cuestión, sistemas y kits de los mismos pueden variar mucho. Por lo general, los sistemas y kits de la invención incluyen sondas, micromatrices de cebadores o micromatrices como se describió anteriormente. Por ejemplo, el kit puede comprender un conjunto de sondas de ARNm como se definió antes, generalmente hechas de ADN, y que pueden estar previamente marcadas. Alternativamente, las sondas  
20 pueden estar sin marcar y los ingredientes para el marcaje se pueden incluir en el kit en contenedores separados. El kit puede comprender además reactivos de hibridación u otros reactivos y materiales adecuadamente empaquetados necesarios para el protocolo de hibridación particular, incluidas matrices en fase sólida, si corresponde, y estándares. Alternativamente, el kit de la invención puede comprender cebadores de amplificación (por ejemplo, cebadores de bucle de vástago) que pueden estar premarcados o pueden contener una purificación por afinidad o una unidad estructural de unión. El kit puede comprender además reactivos de amplificación y también otros reactivos y materiales adecuadamente empaquetados necesarios para el protocolo de amplificación particular. Los sistemas y kits pueden incluir además uno o más reactivos adicionales empleados en los diversos métodos, tales como dNTP y/o rNTP, que pueden ser premezclados o separados, uno o más dNTP y/o rNTP etiquetados de forma única, tal como biotinilado o dNTP etiquetados con Cy3 o Cy5, partículas de oro o plata con diferentes espectros de dispersión u otro reactivo de etiquetado posterior a la síntesis, tales como derivados químicamente activos de colorantes fluorescentes, enzimas, tales como transcriptasas inversas, ADN polimerasas, ARN polimerasas y similares, diversos medios reguladores, por ejemplo, soluciones reguladoras de hibridación y lavado, matrices de sondas prefabricadas, reactivos y componentes de purificación de sondas marcadas, como columnas de centrifugación, etc., reactivos de generación y detección de señales, por ejemplo anticuerpos secundarios marcados, conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina, sustrato quimioluminiscente o quimioluminiscente, y similares.  
35 Además de los componentes anteriores, el kit de la invención puede incluir además instrucciones para practicar los métodos de la presente invención. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits en una variedad de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato apropiado, por ejemplo, un trozo o trozos de papel en los que se imprime la información, en el embalaje del kit, en un prospecto, etc. otro medio sería un medio legible por ordenador, por ejemplo, disquete, CD, etc., en el que se ha grabado la información. Otro medio que puede estar presente es una dirección de sitio web que se puede usar a través de internet para acceder a la información en un sitio eliminado. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

40

45 La invención también se refiere a un kit que comprende medios para medir los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes de BPI, XCL1 y TXNDC3 para realizar los métodos de la invención.

En una realización particular, dichos medios para medir los niveles de expresión de los genes de BPI, XCL1 y TXNDC3 son cebadores y/o sondas de ácido nucleico específicos para dichos genes.

Métodos para ajustar un tratamiento inmunosupresor:

50 La invención proporciona además métodos para desarrollar planes de tratamiento personalizados. La información obtenida mediante los métodos descritos anteriormente se puede usar para desarrollar un plan de tratamiento personalizado para un receptor de trasplante.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para ajustar el tratamiento inmunosupresor administrado a un paciente trasplantado después de su trasplante, que comprende las siguientes etapas de: (i) los métodos de predicción de alteraciones del injerto en un paciente trasplantado y (ii) ajustar el tratamiento inmunosupresor.

55

5 Los métodos se pueden llevar a cabo, por ejemplo, usando cualquiera de los métodos de determinación del riesgo descrito anteriormente y, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, diseñando un plan de tratamiento para el receptor del trasplante. Si el paciente está en riesgo de un resultado clínico no deseado (por ejemplo, alteraciones del injerto y/o rechazo del injerto), dicho paciente es candidato para el tratamiento con una cantidad eficaz de otro tratamiento inmunosupresor que los administrados desde el trasplante (por ejemplo, por un agente antirrechazo). La reducción de las alteraciones del injerto tales como la fibrosis y/o la protección del aloinjerto se puede lograr usando cualquier medio médico apropiado conocido para los expertos en el arte. De hecho, algunos fármacos inmunosupresores se conocen como inductores de fibrosis, tales como por ejemplo inhibidores de la calcineurina (por ejemplo, ciclosporina).

10 En una realización, la etapa de ajustar el tratamiento inmunosupresor consiste en modular la cantidad administrada al paciente trasplantado y/o administrar otro fármaco inmunosupresor.

En una realización particular, dicho otro inmunosupresor es un inhibidor de mTOR (por ejemplo, Sirolimus, Everolimus) que se puede usar en pacientes trasplantados seleccionados, donde los inhibidores de calcineurina (ciclosporina) están contraindicados.

15 En una realización particular, el paciente trasplantado es un paciente renal trasplantado.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras:

20 Figura 1: Cuantificación de la fibrosis intersticial usando un análisis de imagen automatizado pre-(A) y 1 año después del trasplante (B) y eGFR con fórmula MDRD 3 meses después del trasplante (C) y 1 año después del trasplante (D).

Figura 2: curvas ROC que comparan el grupo NL con los demás combinados. BPI, TXNDC3, XCL1 y la suma de valores para estos tres genes exhiben una discriminación significativa ( $p = 0.043, 0.029, 0.025$  y  $0.00015$ , respectivamente).

25 Figura 3: diagrama de Venn de genes diferenciales para cada grupo en comparación con NL. El número de genes diferenciales para cada comparación se muestra con la superposición.

Figura 4: Fenotipo sanguíneo que muestra subconjuntos diferenciales significativos en comparación con el grupo NL.

Ejemplo: La expresión del gen sanguíneo a los 3 meses después del trasplante predice las características histológicas de 1 año en el trasplante renal.

30 Material y métodos

Métodos concisos

35 Pacientes: en este estudio se analizó una cohorte multicéntrica de 79 pacientes con trasplante renal, que recibió una subvención del ministerio de salud francés (id RCB No.: DGS2006/0200) y fue aprobado por the University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biological Risks of Nantes (Francia). Todos los pacientes dieron su consentimiento. Seis centros de trasplante franceses participaron en el estudio (Nantes, París-Necker, Lyon-Heriot, Grenoble, Toulouse y Niza). Los criterios de inclusión fueron: pacientes adultos menores de 66 años que recibieron un primer trasplante de riñón aislado de un donante fallecido con corazón palpitante de menos de 60 años.

40 Análisis histopatológicos: el diagnóstico histológico se centralizó y se realizó según la clasificación actualizada de Banff 2009<sup>13</sup> por 2 patólogos (K.R. y J.P.D.V.H.) cegados a las firmas de sangre. Se evaluaron las biopsias pre y 1 año después del trasplante. Los pacientes se clasificaron en los 4 grupos siguientes: 1) normal, 2) IFTA aislada sin inflamación (IFTA), 3) IFTA aislada con inflamación (i-IFTA), 4) lesiones aloinmunes (grupo ALLO) que acumulan cambios límite, rechazo mediado por células T agudo o crónico y rechazo mediado por anticuerpos agudo o crónico (c-ABMR). Se dio un diagnóstico de IFTA aislada con o sin inflamación (IFTA e i-IFTA) cuando no se observó ninguna otra lesión histológica asociada patente y cuando la IFTA no se observó en el injerto histológico previo a la implantación. La i-IFTA se definió por una puntuación-ti > 0, esto es, por la presencia de inflamación intersticial en el área de la corteza cicatrizada (i-atr) asociada o no con inflamación en el parénquima normal (i-Banff) con una puntuación insuficiente para dar un cambio límite o diagnóstico de rechazo mediado por células T (i-Banff = 0 o 1)<sup>27</sup>.  
45 Los pacientes con nefropatía por el virus BK, según lo definido por la tasa de replicación del virus en la sangre por RT-PCR > 4 log y disfunción renal, fueron excluidos del estudio.

50 Preparación de la muestra de sangre: se recogieron muestras de sangre venosa a los 3 meses después del trasplante en vacutainer con EDTA y se procesaron para su análisis en 4 horas. Las células mononucleares de

sangre periférica (PBMC) se separaron en una capa de Ficoll (Eurobio, Les Ulis, Francia). El ARN se extrajo de la sangre periférica usando el método TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia).

5 Análisis de micromatrices: el análisis se realizó en matrices Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0. Los datos de micromatrices de todas las muestras se normalizaron usando el algoritmo robusto de múltiples matrices (RMA) y se realizó una corrección por lotes con el algoritmo Combat de acuerdo con micromatrices procesados en Nantes y en los datos de otros centros. Se usó una prueba de Student modificada para multipruebas (valor de  $p < 0.05$ ) y un cambio de pliegue de al menos 1.25 para identificar genes expresados diferencialmente. La significancia biológica de los genes seleccionados se evaluó usando el software GOMiner<sup>28</sup>. Los datos de micromatrices sin procesar se depositaron en la base de datos Ominibus de expresión génica (GEO) y son accesibles a través del número de acceso de la serie GEO GSE57731.

10 Fenotipado sanguíneo: la citometría de flujo se realizó en un BD LSRII (BD Biosciences, Pont de Claix, Francia) y los datos se analizaron con el software FlowJo (TriStar Inc, Ashland, OR, EE. UU.) usando cinco combinaciones de anticuerpos monoclonales (mAb). Todos los experimentos se realizaron en PBMC congelados.

15 Análisis estadístico: se usaron pruebas no paramétricas de Mann-Whitney o Kruskal Wallis para las comparaciones grupales. La regresión logística se usó para evaluar la relación entre la biopsia de 12 meses (NL versus otros grupos en total) y las covariables. Las pruebas estadísticas se realizaron con el software R. Se usó el software Graph PadPrism v.4 (Graph Pad Prism Software, San Diego, CA, EE. UU.) y las diferencias se representaron de la siguiente manera: \*cuando  $p < 0.05$ , \*\*cuando  $p < 0.01$  y \*\*\*cuando  $p < 0.001$ .

#### Resultados

20 Características demográficas: se seleccionaron 125 receptores de injerto de riñón por primera vez, de los cuales 79 cumplieron el seguimiento completo de un año con histología interpretable antes del implante del injerto y al año. La media de edad de los receptores fue de 43.67 años  $\pm$  SD: 10.47 (intervalo: 20.10-63.0) con 73% de hombres y la edad media del donante fue de 41.31  $\pm$  12.41 (12.0-65.0) con 61% de hombres (tabla 1). La media de incompatibilidad HLA-A-B-DR fue 3.44  $\pm$  1.09 (0.0-5.0). Todos los pacientes recibieron Tacrolimus y micofenolato mofetilo. Todos los pacientes recibieron terapia de inducción de basiliximab excepto 2 que recibieron timoglobulina de conejo. Solo 2 pacientes estaban libres de esteroides, uno con diabetes y el otro con leucopenia. No hubo muerte durante el primer año después del trasplante, con una media de eGFR al año de 57.14 mL/min/1.73m<sup>2</sup>  $\pm$  16.88 (17.71-108.0) y una proteinuria diaria de 0.26 g/24h  $\pm$  0.31 (0.0-2.0). Ocho pacientes (10%) presentaron un episodio de rechazo agudo dentro del primer año. Al año, 4 pacientes presentaron DSA.

**Tabla 1: Características demográficas de la cohorte (A) y distribución de los criterios de Banff (B) (media  $\pm$  SD e intervalo o porcentajes entre paréntesis). Se indica el valor p de la prueba Kruskal-Wallis.**

A	Todos (n = 79)	NL (n = 45)	IFTA (n = 14)	iIFTA (n = 14)	ALLO (n = 6)	valor p
GFR estimado a 3 meses $\pm$ mL/min/1.73 m <sup>2</sup>	53.65 $\pm$ 17.78 (18.39-100.0)	58.04 $\pm$ 17.66 (23.87-100.0)	46.34 $\pm$ 14.47 (24.12-71.51)	45.09 $\pm$ 13.71 (18.39-63.10)	56.34 $\pm$ 25.81 (34.46-97.80)	0.082
GFR estimado a 1 año $\pm$ mL/min/1.73 m <sup>2</sup>	57.14 $\pm$ 16.88 (17.71-108.0)	60.91 $\pm$ 16.13 (2 6.56-108)	49.00 $\pm$ 10.50 (35.35-66.60)	52.40 $\pm$ 22.18 (17.71-94.36)	57.23 $\pm$ 16.72 (34.41-79.03)	0.071
Proteinuria a los 3 meses $\pm$ g/24h	0.23 $\pm$ 0.17 (0.04-0.78)	0.23 $\pm$ 0.19 (0.04-0.78)	0.23 $\pm$ 0.15 (0.10-0.68)	0.23 $\pm$ 0.17 (0.05-0.55)	0.13 $\pm$ 0.08 (0.04-0.20)	0.65
Proteinuria a 1 año $\pm$ g/24h	0.26 $\pm$ 0.31 (0.0-2.0)	0.22 $\pm$ 0.19 (0.0-0.97)	0.20 $\pm$ 0.11 (0.09-0.41)	0.45 $\pm$ 0.59 (0.0-2.0)	0.18 $\pm$ 0.14 (0.04-0.36)	0.94
Receptor masculino	55/75 (73%)	29/43 (67%)	11/13 (84%)	11/13 (84%)	4/6 (66%)	0.072
Edad del receptor	43.67 $\pm$ 10.47 (20.10-63.0)	43.77 $\pm$ 11.01 (20.10-63.0)	45.13 $\pm$ 10.86 (24.00-59.40)	43.33 $\pm$ 10.20 (25.90-59.40)	40.57 $\pm$ 7.382 (27.20-48.60)	0.77
Donante masculino	44/72 (61%)	26/41 (63%)	8/13 (62%)	8/12 (67%)	2/6 (33%)	0.57
Edad del donante	41.31 $\pm$ 12.41 (12.00-65.00)	41.10 $\pm$ 12.86 (12.00-65.00)	44.31 $\pm$ 14.12 (20.00-61.00)	37.83 $\pm$ 9.64 (20.00-50.00)	43.17 $\pm$ 11.11 (29.00-54.00)	0.49
Enfermedad recurrente	19/75 (25.3%)	13/42 (31.0%)	3/13 (23.1%)	2/14 (14.3%)	1/6 (16.7%)	0.60
HLA-ABDR errores	3.44 $\pm$ 1.09 (0.0-5.0)	3.43 $\pm$ 1.17 (0.0-5.0)	3.31 $\pm$ 1.11 (1.0-4.0)	3.50 $\pm$ 0.94 (1.0-5.0)	3.67 $\pm$ 1.03 (2.0-5.0)	0.95
inducción Basiliximab	70/72 (97.2%)	40/41 (97.6%)	13/13 (100%)	11/12 (91.7%)	6/6 (100%)	nd
Uso de tacrolimus en el tratamiento inicial	76/76 (100%)	43/43 (100%)	13/13 (100%)	14/14 (100%)	6/6 (100%)	nd
Corticosteroides	70/72 (97.2%)	40/41 (97.6%)	13/13 (100%)	11/12 (91.7%)	6/6 (100%)	nd
DSA a 1 año	4/73 (5.5%)	2/41 (4.5%)	0/14(0%)	1/12 (8.3%)	1/6 (16.7%)	nd
SON ocurrencia durante el primer año		8/77 (10.4%)	4/44 (9.1%)	1/13 (7.7%)	2/14 (14.3%)	1/6 (16.7%) nd

B	Todos (n = 79)	NL (n = 45)	IFTA (n = 14)	i-IFTA (n = 14)	ALLO (n = 6)	valor p	Comparación significativa
g	0.089 $\pm$ 0.33 (0-2)	0.0 $\pm$ 0.0 (0-0)	0.14 $\pm$ 0.36 (0-1)	0.29 $\pm$ 0.61 (0-2)	0.17 $\pm$ 0.041 (0-1)	0.028	NL vs p<0.05 IFTA:
ptc	0.053 $\pm$ 0.28 (0-2)	0 $\pm$ 0 (0-0)	0 $\pm$ 0 (0-0)	0.15 $\pm$ 0.38 (0-1)	0.33 $\pm$ 0.82 (0-2)	0.028	ns

(continuación)

<b>B</b>	<b>Todos (n = 79)</b>	<b>NL (n = 45)</b>	<b>IFTA (n = 14)</b>	<b>i-IFTA (n = 14)</b>	<b>ALLO (n = 6)</b>	<b>valor p</b>	<b>Comparación significativa</b>
i	0.089 ±0.33 (0-2)	0.022 ±0.15	0 ±0 (0-0)	0.14 ±0.0.36 (0-1)	0.67 ±0.82 (0-2)	0.002	iIFTA vs p<0.05 ALLO; NL vs p<0.0001 ALLO; IFTA vs p<0.0001 ALLO;
t	0.20 ±0.54 (0-2)	0.044 ±0.21 (0-1)	0 ±0 (0-0)	0.36 ±0.63 (0-2)	1.5 ±0.84 (0-2)	P<0.0001	i-IFTA vs p<0.001 ALLO; NL vs p<0.0001 ALLO; IFTA vs p<0.0001 ALLO;
cg	0 ±0 (0-0)	0 ±0 (0-0)	0 ±0 (0-0)	0 ±0 (0-0)	0 ±0 (0-0)		
ci	0.66 ±0.088 (0-3)	0.13 ±0.34 (0-1)	1.07 ±0.27 (1-2)	1.43 ±0.0.65 (1-3)	1.83 ±0.98 (1-3)	P<0.0001	NL vs p<0.0001 IFTA; NL vs p<0.000 i-IFTA; NL vs p<0.0001 ALLO;
ct	0.85 ±0.72 (0-3)	0.47 ±0.50 (0-1)	1.07 ±0.27 (0-2)	1.43 ±0.65 (1-3)	1.83 ±0.98 (1-3)	P<0.0001	±**: NL vs ***; NL vs ***; NL vs IFTA; i-IFTA; ALLO
ti	0.44 ±0.68 (0-3)	0.18 ±0.39 (0-1)	0 ±0 (0-0)	1.07 ±0.27 (1-2)	1.83 ±0.98 (1-3)	P<0.0001	±***; NL IFTA; *** vs i- NL vs ALLO; ***IFTA vs i-IFTA; ***; IFTA vs ALLO

Características demográficas según las características histológicas: Se realizaron análisis histológicos en biopsias pre y 1 año después del trasplante para los 79 pacientes. Las biopsias previas a la implantación se usaron para excluir del análisis las características preexistentes, esto es, solo se analizan las características que aparecen después del trasplante. Los pacientes se clasificaron en cuatro categorías siguiendo la clasificación de Banff de 2009<sup>13</sup>: 45 pacientes se clasificaron con biopsia normal (NL), 14 IFTA aisladas sin inflamación (IFTA), 14 IFTA aisladas con inflamación (i-IFTA) y 6 lesiones aloinmunes que presentan (ALLO), combinando cambios límite, rechazo mediado por células T agudo o crónico y rechazo mediado por anticuerpos agudo o crónico (c-ABMR) (tabla 1). No hubo diferencias funcionales entre los 4 grupos en la función estimada del injerto (eGFR) usando la fórmula MDRD ya sea 3 meses después del trasplante, cuando se recogieron muestras de sangre para el análisis de fenotipos celulares y micromatrices, o 1 año después del trasplante cuando se realizó la histología (figura 1, tabla 1). Sin embargo, los pacientes con IFTA e i-IFTA mostraron alrededor de 10 mL/min/1.72m<sup>2</sup> de eGFR más bajo a los 3 meses y un año que los pacientes con NL o ALLO. Esta diferencia no es estadísticamente significativa y puede estar relacionada con el tamaño de la muestra en cada grupo. Finalmente, el grupo ALLO inmune tendió a tener receptores más jóvenes que los otros grupos. La cuantificación independiente de la fibrosis usando un procedimiento de análisis de imagen automatizado confirmó un porcentaje significativamente mayor de fibrosis 1 año después del trasplante en pacientes con IFTA e i-IFTA en comparación con pacientes con NL (p <0.05 y p <0.001, respectivamente), mientras que no hubo diferencia observado en el momento del trasplante (figura 1).

Una firma de genes de sangre de 3 meses para histología normal: Primero comparamos la expresión de genes de sangre de los pacientes con histología NL con todos los otros grupos (IFTA, i-IFTA y ALLO) para evaluar si la expresión de genes en la sangre en 3 meses podría estar asociada con histología "normal versus anormal" al año. Seis genes se expresaron significativamente de manera diferencial entre el grupo NL y los otros (tabla complementaria 1). Además, tres de ellos, BPI (proteína bactericida/que aumenta la permeabilidad), XCL1 (ligando 1 quimiocina (motivo C)) y TXNDC3 (3 que contiene el dominio de tiorredoxina) exhibieron un área significativa bajo la curva (AUC) en los análisis característicos operativos del receptor (ROC) (tabla complementaria 1) y la combinación simple de estos 3 marcadores, esto es, la suma de los valores de expresión, permitió la diferenciación de pacientes con NL de otros, con una AUC de 0.73 (CI<sub>95%</sub> = [0.61, 0.85], p = 0.00015) (Figura 2). La exclusión de los 2 pacientes que recibieron inducción de timoglobulina de conejo y los 2 que estaban libres de esteroides resultó en una AUC significativa de 0.77 (CI<sub>95%</sub> = [0.65, 0.88], p <0.0001). Además, los análisis univariados/multivariados destacaron que el eGFR a 3 meses (fórmula MDRD) y la suma de estos tres genes se asociaron significativamente con la predicción del estado de la biopsia a 1 año (valor p de Wald = 0.025 y 0.0085, respectivamente). Cuando se combinaron ambos parámetros, la precisión de la predicción mejora con una AUC de 0.75 (CI<sub>95%</sub> = [0.64, 0.87], p <0.0001) y una validación de remuestreo bootstrap confirmó la estabilidad de este biomarcador compuesto que muestra una AUC de 0.76 (CI<sub>95%</sub> = [0.64, 0.86], p <0.0001).

Tabla complementaria 1: 6 genes significativamente diferenciados entre el grupo normal y otros grupos.

Símbolo	Nombre del gen	Entrada	FC	p	ROC valor p	AUC	95% IC AUC
GPR84	Receptor acoplado a proteína G 84	53831	-1.33	0.044	0.073	0.62	0.49-0.74
BPI	Proteína bactericida/aumento de la permeabilidad	671	-1.45	0.039	0.043	0.63	0.51-0.76
XCL1	ligando 1 de la quimiocina (motivo C)	6375	-1.27	0.025	0.025	0.65	0.52-0.77
LGALS1	lectina, similar a la unión a galactosido	29094	-1.28	0.043	0.066	0.62	0.50-0.75
TXNDC3	3 que contiene el dominio tiorredoxina (espermatzoide)	51314	-1.25	0.041	0.029	0.64	0.52-0.76
BNIP3	Proteína 3 que interactúa BCL2/adenovirus E1B 19kDa	664	1.28	0.044	0.15	0.63	0.45-0.81

Firmas genéticas asociadas con lesiones histológicas de 1 año: para identificar firmas genéticas específicas de la sangre a los tres meses asociados con cada característica histológica al año, los tres grupos, IFTA, i-IFTA y ALLO, se compararon por separado con el grupo NL (figura 3). Noventa y tres genes (56 regulados hacia abajo y 37 regulados hacia arriba) se expresaron diferencialmente entre los grupos IFTA y NL. El análisis de ontología génica (GO) evidenció categorías genéticas relacionadas principalmente con la homeostasis celular y la función de coagulación/plaquetas (tabla 2), tales como las integrinas alfa 2b y beta 3 (CD41/CD61) y lectinas (CLEC1B, -4A, -12A, -12B), que se expresan a la baja en IFTA en comparación con NL. Del mismo modo, 27 genes (10 regulados

- 5 hacia abajo y 17 regulados hacia arriba) se expresaron diferencialmente entre los grupos i-IFTA y NL. Entre estos, identificamos genes relacionados con el sistema inmunitario, tales como los genes subexpresados CD8B, XCL1, IL31RA (receptor A de interleucina 31 A), MIR142 (microARN 142) y los genes sobreexpresados CX3CR1 (receptor 1 de la quimiocina (motivo C-X3-C)), KLRF1 (lectina de células asesinas como subfamilia de receptores F, miembro 1), EGR1 (respuesta de crecimiento temprano 1), TMEM1764A y TMEM176B (proteínas transmembrana 176A y 176B). No se encontró un enriquecimiento significativo de GO entre estos dos grupos de pacientes, probablemente debido al número demasiado bajo de genes. Finalmente, 291 genes (218 regulados hacia abajo y 73 regulados hacia arriba) se expresaron diferencialmente entre los grupos ALLO y NL. Como se esperaba, el análisis GO también destacó los enriquecimientos significativos de los genes relacionados con el sistema inmune (tabla 3) con un total de 54 genes, entre los cuales los genes que codifican la molécula CD24, los receptores de interleucina 1 (tipo I, tipo II y antagonista (IL1R1, IL1R2, IL1RN), metaloproteínasa 8 y 9 (MMP8, MMP9) regulados hacia abajo en el grupo ALLO. Mediante el análisis de enriquecimiento de tipo celular de la base de datos Enrich<sup>14</sup>, identificamos un enriquecimiento de transcripciones de tipo celular relacionadas con células mieloides CD33<sup>+</sup> y monocitos CD14<sup>+</sup> (p <0.001 y 0.004, respectivamente) en el grupo ALLO.
- 10
- 15 En conjunto, identificamos tres firmas genéticas diferenciales distintas y significativas en la sangre a los 3 meses después del trasplante, asociadas con eventos IFTA, i-IFTA y ALLO de 1 año con un gradiente a favor de los genes relacionados con la inmunidad en el último grupo, lo que sugiere que vale la pena considerar la firma de sangre en la clínica. Curiosamente, solo se encontró una pequeña superposición entre las firmas, lo que refuerza su especificidad (figura 3).
- 20 Tabla 2: Enriquecimiento de GO para el grupo IFTA en comparación con el NL. Solo se seleccionó GO con tasa de descubrimiento falso (FDR) inferior al 5%.

	Categoría GO	Nombre GO	Total de genes	Cambios de genes	Enriquecimiento	FDR
1	GO:0050896	respuesta al estímulo	4180	36	2.0	.001
2	GO:0046903	secreción	636	13	4.7	.001
3	GO:0002576	desgranulación plaquetaria	82	6	16.8	.001
4	GO:0030168	activación plaquetaria	233	8	7.9	0.003
5	GO:0007608	percepción sensorial del olfato	365	9	5.7	0.005
6	GO:0006887	exocitosis	222	7	7.2	0.008
7	GO:0007606	percepción sensorial del estímulo químico	407	9	5.1	.008
8	GO:0032940	secreción por célula	530	10	4.3	0.010
9	GO:0050878	regulación de los niveles de fluidos corporales	454	9	4.5	0.014
10	GO:0007599	hemostasia	386	8	4.8	0.023
11	GO:0006950	respuesta al estrés	2170	21	2.2	0.024
12	GO:0050817	coagulación	383	8	4.8	0.024
13	GO:0007596	coagulación de la sangre	380	8	4.8	0.025
14	GO:0045595	regulación de la diferenciación celular	586	10	3.9	0.026
15	GO:0001775	activación celular	616	10	3.7	0.029
16	GO:0050793	regulación del procedimiento de desarrollo	787	11	3.2	0.046

Tabla 3: Enriquecimiento de GO para el grupo ALLO en comparación con el NL. Solo se seleccionó GO con FDR inferior al 5%.

	Categoría GO	Nombre GO	Total de genes	Cambios de genes	Enriquecimiento	FDR
--	--------------	-----------	----------------	------------------	-----------------	-----

1	GO:0002376	procedimiento del sistema inmune	1243	42	2.3	0.000
2	GO:0006952	respuesta de defensa	773	31	2.7	0.000
3	GO:0006955	respuesta inmune	761	28	2.5	0.003
4	GO:0009617	respuesta a la bacteria	229	14	4.1	0.004
5	GO:0042742	respuesta de defensa a la bacteria	107	9	5.6	0.011
6	GO:0002444	inmunidad mediada por leucocitos mieloides	29	5	11.6	0.019

5 Enriquecimiento único de genes inmunorelacionados diferenciales en grupos IFTA, i-IFTA y ALLO: IFTA e i-IFTA muestran, respectivamente, 93 y 27 genes que se expresan diferencialmente a los tres meses en comparación con el grupo NL. Entre ellos, solo había 2 genes comunes (BAGE3 (familia de antígeno de melanoma B, miembro 3) y homólogo DNAJA1P5 (DnaJ (Hsp40), subfamilia A, miembro 1 pseudogen 5)) (figura 3), lo que sugiere diferentes firmas entre las dos situaciones de IFTA que dependen del componente inflamatorio. Para determinar esto, IFTA e i-IFTA se compararon directamente y se encontró que 258 genes se expresaban diferencialmente. El análisis GO y la base de datos Enrichr revelaron un enriquecimiento de 58 genes únicos, algunos relacionados con los monocitos CD14<sup>+</sup>, incluidos los genes sobreexpresados que codifican moléculas inmunorelacionadas tales como CD36, CD93, 10 TLR5 (receptor 5 tipo toll) y CCR2 (receptor 2 de la quimiocina (motivo C-C)) (tabla 4). De manera similar, los grupos i-IFTA y ALLO se compararon directamente y se encontró que, entre los 291 genes diferenciales asociados con el grupo ALLO y los 27 asociados con i-IFTA, solo un gen (BAGE3) era común en las dos situaciones, haciendo hincapié en la idea de que los mecanismos celulares y la mayoría de los mecanismos inmunes generales de las reacciones aloinmunes e i-IFTA son distintos.

15 Tabla 4: Enriquecimiento de GO para el grupo i-IFTA en comparación con el grupo IFTA. Solo se seleccionó GO con una FDR inferior al 5%.

	Categoría GO	Nombre GO	Total de genes	Cambios de genes	Enriquecimiento	FDR
1	GO:0001775	activación celular	616	27	3.3	0.000
2	GO:0002376	procedimiento del sistema inmune	1243	37	2.3	0.001
3	GO:0042116	activación de macrófagos	28	6	16.3	0.002
4	GO:0045321	activación de leucocitos	402	18	3.4	0.002
5	GO:0002682	regulación del procedimiento del sistema inmune	595	22	2.8	0.004
6	GO:0002274	activación de leucocitos mieloides	75	7	7.1	0.017
7	GO:0002237	respuesta a la molécula de origen bacteriano	136	9	5.0	0.017
8	GO:0006952	respuesta de defensa	773	24	2.4	0.020
9	GO:0032496	respuesta al lipopolisacárido	125	8	4.9	0.038
10	GO:0009617	respuesta a la bacteria	229	11	3.7	0.040
11	GO:0006950	respuesta al estrés	2170	47	1.6	0.041

20 Análisis del fenotipo sanguíneo: se analizaron sangre periférica de los grupos IFTA (n = 10), i-IFTA (n = 10) y NL (n = 36) a los tres meses después del trasplante usando citometría de flujo. La comparación de los tres grupos juntos no destacó ninguna diferencia significativa en la frecuencia celular. De este modo, no se usó ningún parámetro de fenotipo de predicción de la histología de 1 año en asociación con la expresión génica. Sin embargo, cuando se comparó IFTA con el grupo NL solamente, la frecuencia de las células CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>B de memoria no conmutadas fue significativamente más baja en el grupo IFTA (NL = 7.70%, CI<sub>95%</sub> = [7.48, 12.49]; IFTA = 4.48%, CI<sub>95%</sub> = [3.50, 7.84], p = 0.047) (figura 4A). El grupo i-IFTA, en comparación con el grupo NL, se caracterizó por una frecuencia más baja de células B de memoria negativa doble CD27-IgD-IgM- (NL = 85.0%, CI<sub>95%</sub> = [73.34, 84.49]; i-IFTA = 72.05%, CI<sub>95%</sub>

= [63.15, 80.65],  $p = 0.034$ ) (figura 4B) y por una expresión más baja de NKp80 (MFI) en las células NK secretoras (NL = 1940,  $CI_{95\%} = [1773, 2192]$ ; i-IFTA = 1292,  $CI_{95\%} = [936.1, 1865]$ ,  $p = 0.018$ ) y transicionales ( $p = 0.043$ ; NL = 1532,  $CI_{95\%} = [1376, 1705]$ ; i-IFTA = 1137,  $CI_{95\%} = [818.7, 1527]$ ) en comparación con el grupo NL (figura 4C, 4D).

5 En conjunto, hay una frecuencia más baja de células B de memoria no conmutadas en IFTA y una disminución en las células B de memoria doble negativa y la expresión de NKp80 en células NK secretoras y de transición en i-IFTA. No se encontró ninguna otra modificación a nivel celular.

#### Discusión:

10 El análisis histológico de la biopsia de aloinjerto sigue siendo el estándar de oro para evaluar las alteraciones del injerto. Varios estudios demuestran que tales alteraciones están asociadas con cambios en los conjuntos de transcripciones que representan inflamación y lesión en aloinjertos renales<sup>7, 8, 12, 15, 16</sup>. La presencia de lesiones histológicas tales como fibrosis e inflamación en biopsias de protocolo de 1 año se asocia con función y supervivencia de injerto reducido<sup>6</sup>. Sin embargo, las biopsias pueden implicar complicaciones graves<sup>9, 10</sup>.

15 Se evaluó la expresión génica y el fenotipo celular en sangre de 79 receptores de riñón por primera vez 3 meses después del trasplante en comparación con los estados histológicos un año después de la biopsia de vigilancia tras el trasplante con el objetivo de determinar si la sangre podría ser un compartimento valioso para la predicción temprana de alteraciones del injerto, reduciendo el riesgo de complicaciones y proporcionando una herramienta para la toma de decisiones temprana. De acuerdo con el desarrollo de un biomarcador predictivo, esto es, antes de la alteración funcional, no se observó ningún cambio en la función renal en nuestra cohorte entre 3 meses y 1 año de seguimiento. Para reducir la variabilidad en la interpretación de la lesión tanto como sea posible, el diagnóstico histológico fue realizado de forma independiente por 2 patólogos. La cuantificación de la fibrosis, usando el análisis de imagen automatizado<sup>17</sup>, confirmó la aparición significativa de fibrosis entre la biopsia previa a la implantación y las biopsias de vigilancia de un año en los grupos IFTA e i-IFTA.

20 La comparación de pacientes con histología normal y los 3 grupos de pacientes con características histológicas anormales permitió la identificación de 6 genes expresados diferencialmente. La combinación de 3 de ellos permite una buena discriminación, con un AUC de 0.73 ( $CI_{95\%} = [0.61, 0.85]$ ,  $p = 0.00015$ ). Se encontró que esta suma de expresión de estos 3 genes y la eGFR de 3 meses eran predictores independientes de histología de injerto de 12 meses y su combinación permite alcanzar una buena precisión discriminatoria con una AUC de 0.76 ( $CI_{95\%} = [0.64, 0.86]$ ,  $p < 0.0001$ ) después de la validación de remuestreo bootstrap. Este biomarcador compuesto ofrece un biomarcador potencial temprano, mínimamente invasivo, con buena capacidad predictiva para distinguir a los 3 meses después del trasplante los pacientes que exhibirán una biopsia anormal 1 año después del trasplante. La identificación de biomarcadores predictivos aumenta la posibilidad de estratificar a los pacientes, evitando la biopsia de 1 año para pacientes con una histología normal y adaptando el tratamiento. Tal tratamiento profiláctico también sería de interés para los pacientes con aloinjertos de alto riesgo, incluidos aquellos con una prueba cruzada positiva<sup>18</sup>, que podrían beneficiarse de ajustes tempranos a sus regímenes inmunosupresores.

35 Nuestros datos confirman que la sangre es un buen compartimento, no solo para identificar biomarcadores asociados con lesiones de aloinjerto como se informó previamente en el rechazo agudo<sup>11, 12</sup>, sino también de predicción de lesiones histológicas. Además, debido a que la toma de muestras es mínimamente invasiva y fácil de repetir, la sangre potencialmente representa una fuente óptima y segura de biomarcadores predictivos.

40 Nuestros datos también sugieren que 3 meses pueden ser un buen punto para la detección temprana de eventos anormales. De hecho, Mengel and colleagues mostraron que el análisis de la expresión génica en las biopsias de protocolo de 6 semanas refleja principalmente la respuesta de reparación de la lesión al estrés de la implantación después del trasplante<sup>19</sup>. Esto sugiere que los eventos moleculares que afectan los resultados del aloinjerto están inicialmente ocultos por la respuesta de reparación de tejidos, por ejemplo, un aumento inicial en los genes inmunoasociados adaptativos 1 mes después del trasplante se reduce más tarde en un análisis longitudinal<sup>20</sup>. La estabilidad de nuestra firma en el tiempo necesita ser investigada para definir durante qué lapso de tiempo su sensibilidad es óptima.

45 En comparación con el grupo NL, las características histológicas distintas de los otros tres grupos de pacientes están asociadas con firmas genéticas específicas con perfiles biológicos coherentes y muy poca superposición. El grupo ALLO exhibe una firma clara de genes relacionados con el sistema inmune que evidencian procedimientos inmunológicos activos y, de este modo, validan nuestro enfoque transcripcional. La sobreexpresión de CD24, un gen expresado en células B maduras, podría explicarse por la infiltración de células B y mastocitos informada después de la inflamación, mientras que la sobreexpresión de genes MMP8/9 se ajusta a la remodelación de tejidos que ocurre en el tejido lesionado<sup>5, 7, 21</sup>. En contraste con los otros dos grupos de pacientes, el grupo i-IFTA está asociado con pocos genes diferenciales en comparación con el grupo NL, pero estos incluyen genes relacionados con el sistema inmune: TMEM1764B (también llamado TORID) y su socio TMEM1764A estaban regulados hacia arriba en i-IFTA (FC = 1.8 y 2.0, respectivamente). Curiosamente, se ha demostrado que estos dos genes desempeñan un papel en la maduración de las células dendríticas y son necesarios para la presentación de antígenos de donantes a las células T CD8<sup>+22, 23</sup>. TMEM1764B y su socio TMEM1764A también están regulados hacia arriba en sangre de pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo<sup>24</sup>. La presencia de estos genes en esta situación particular se

ajusta al aumento de infiltrado de macrófagos/células dendríticas (células CD68<sup>+</sup>) observado en biopsias con fibrosis y signos de inflamación<sup>6</sup>. Por el contrario, se encontró que otras moléculas, principalmente relacionadas con los linfocitos, tenían una expresión más baja en i-IFTA, incluidos CD8B, XCL1, IL31RA y MIR142, marcadores de migración y referencia. Esto probablemente se correlaciona con la migración de linfocitos sanguíneos hacia el injerto, como se describió anteriormente en biopsias de un año con fibrosis e inflamación<sup>6</sup>, lo que sugiere que la migración de linfocitos aparece apenas 3 meses después del trasplante.

El grupo IFTA se asoció con 93 genes diferenciales en comparación con pacientes con NL que incluyen algunas integrinas y lectinas y el enriquecimiento de plaquetas y GO relacionado con la coagulación. La modulación de estos genes que codifican las integrinas puede ser el resultado de una adaptación de las células sanguíneas inducida por la modificación de la matriz extracelular en injertos con lesiones de IFTA como se describió ampliamente anteriormente<sup>7</sup>. Esto encaja con el hecho de que la administración del inhibidor de la activación plaquetaria retrasa la fibrosis durante la disfunción crónica del aloinjerto renal<sup>25</sup>. Curiosamente, y en contraste con nuestros resultados, se ha informado que la IFTA está asociada con un aumento en los genes relacionados con el sistema inmune en las biopsias<sup>7, 16, 21</sup>. Sin embargo, en estos estudios, no se hizo distinción entre pacientes con IFTA y aquellos con i-IFTA, explicando por qué solo se encontró genes diferenciales relacionados con el sistema inmune en la sangre de pacientes con i-IFTA. Por ejemplo, 16 de 17 pacientes tenían una puntuación igual a 2 o 3 en el grupo de IFTA en Maluf et al., En nuestro estudio, se habrían clasificado a estos pacientes como i-IFTA<sup>21</sup>.

En conjunto, nuestros resultados sugieren claramente una expresión más baja de genes relacionados con el sistema inmune en la periferia como un reflejo de la infiltración del injerto en i-IFTA pero no en biopsias de IFTA. Curiosamente, estos datos están de acuerdo con el fenotipo sanguíneo de los pacientes. Encontramos una frecuencia más baja de células B de memoria negativa CD27-IgD-IgM-doble y una disminución de la expresión de NKp80 en células NK secretoras y de transición en i-IFTA en comparación con el grupo NL. Estos datos se ajustan con un tráfico de células inmunes desde la sangre al aloinjerto, en el sitio de inflamación y particularmente con el infiltrado relacionado con células B más alto observado en i-IFTA<sup>5</sup>.

Muy pocos genes diferenciales destacados en la sangre receptora en este estudio se han informado previamente en biopsias de aloinjerto. Esto está de acuerdo con Flechner et al. quienes informaron sobre muy pocos genes comunes entre el grupo de linfocitos circulantes y la biopsia en pacientes con trasplantes que funcionan bien o con rechazo agudo<sup>12</sup>. Esto puede deberse a la localización celular específica del compartimiento y la expresión génica, así como al movimiento de las células activadas desde la sangre periférica a través del riñón, como se describió anteriormente.

En conclusión, aunque se ha informado ampliamente que el perfil de expresión génica en la biopsia está asociado con la alteración del injerto, se ha prestado poca atención a los patrones en la periferia. Nuestro estudio muestra que la expresión génica en las células de sangre periférica podría predecir qué pacientes tendrán una histología anormal a 1 año después del trasplante, permitiendo la adaptación temprana de los procedimientos de manejo clínico antes de la lesión del injerto. Estos datos sugieren que la sangre puede ser un compartimiento satisfactorio para predecir indirectamente el resultado del injerto, reduciendo el riesgo de rechazo y la necesidad de hospitalización. De este modo, sería de interés integrar estos biomarcadores en el arsenal clínico de toma de decisiones de los médicos al considerar el manejo clínico más apropiado.

#### Referencias

- A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta invención.
1. Nankivell, BJ, Borrows, RJ, Fung, CL, O'Connell, PJ, Allen, RD, Chapman, JR: The natural history of chronic allograft nephropathy. *The New England journal of medicine*, 349: 2326-2333, 2003.
  2. Seron, D, Moreso, F, Bover, J, Condom, E, Gil-Vernet, S, Canas, C, Fulladosa, X, Torras, J, Carrera, M, Grinyo, JM, Alsina, J: Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney international*, 51: 310-316, 1997.
  3. Mannon, RB, Matas, AJ, Grande, J, Leduc, R, Connett, J, Kasiske, B, Cecka, JM, Gaston, RS, Cosio, F, Gourishankar, S, Halloran, PF, Hunsicker, L, Rush, D, De, KAFI: Inflammation in areas of tubular atrophy in kidney allograft biopsies: a potent predictor of allograft failure. *Am J Transplant*, 10: 2066-2073, 2010.
  4. Cosio, FG, Grande, JP, Wadei, H, Larson, TS, Griffin, MD, Stegall, MD: Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies. *Am J Transplant*, 5: 2464-2472, 2005.
  5. Mengel, M, Reeve, J, Bunnag, S, Einecke, G, Sis, B, Mueller, T, Kaplan, B, Halloran, PF: Molecular correlates of scarring in kidney transplants: the emergence of mast cell transcripts. *Am J Transplant*, 9: 169-178, 2009.
  6. Park, WD, Griffin, MD, Cornell, LD, Cosio, FG, Stegall, MD: Fibrosis with inflammation at one year predicts transplant functional decline. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 21: 1987-1997, 2010.
  7. Scherer, A, Gwinner, W, Mengel, M, Kirsch, T, Raulf, F, Szustakowski, JD, Hartmann, N, Staedtler, F, Engel, G, Klupp, J, Korn, A, Kehren, J, Haller, H: Transcriptome changes in renal allograft protocol biopsies at 3 months

- precede the onset of interstitial fibrosis/tubular atrophy (IF/TA) at 6 months. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 24: 2567-2575, 2009.
- 5 8. Naesens, M, Khatri, P, Li, L, Sigdel, TK, Vitalone, MJ, Chen, R, Butte, AJ, Salvatierra, O, Sarwal, MM: Progressive histological damage in renal allografts is associated with expression of innate and adaptive immunity genes. *Kidney international*, 80: 1364-1376, 2011.
9. Thauinat, O, Legendre, C, Morelon, E, Kreis, H, Mamzer-Bruneel, MF: To biopsy or not to biopsy? Should we screen the histology of stable renal grafts? *Transplantation*, 84: 671-676, 2007.
- 10 10. Furness, PN, Philpott, CM, Chorbadian, MT, Nicholson, ML, Bosmans, JL, Corthouts, BL, Bogers, JJ, Schwarz, A, Gwinner, W, Haller, H, Mengel, M, Seron, D, Moreso, F, Canas, C: Protocol biopsy of the stable renal transplant: a multicenter study of methods and complication rates. *Transplantation*, 76: 969-973, 2003.
11. Gunther, OP, Balshaw, RF, Scherer, A, Hollander, Z, Mui, A, Triche, TJ, Freue, GC, Li, G, Ng, RT, Wilson-McManus, J, McMaster, WR, McManus, BM, Keown, PA, Biomarkers in Transplantation, T: Functional genomic analysis of peripheral blood during early acute renal allograft rejection. *Transplantation*, 88: 942-951, 2009.
- 15 12. Flechner, SM, Kurian, SM, Head, SR, Sharp, SM, Whisenant, TC, Zhang, J, Chismar, JD, Horvath, S, Mondala, T, Gilmartin, T, Cook, DJ, Kay, SA, Walker, JR, Salomon, DR: Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. *Am J Transplant*, 4: 1475-1489, 2004.
- 20 13. Sis, B, Mengel, M, Haas, M, Colvin, RB, Halloran, PF, Racusen, LC, Solez, K, Baldwin, WM, 3rd, Bracamonte, ER, Broecker, V, Cosio, F, Demetris, AJ, Drachenberg, C, Einecke, G, Gloor, J, Glotz, D, Kraus, E, Legendre, C, Liapis, H, Mannon, RB, Nankivell, BJ, Nickleit, V, Papadimitriou, JC, Randhawa, P, Regele, H, Renaudin, K, Rodriguez, ER, Seron, D, Seshan, S, Suthanthiran, M, Wasowska, BA, Zachary, A, Zeevi, A: Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant*, 10: 464-471, 2010.
- 25 14. Chen, EY, Tan, CM, Kou, Y, Duan, Q, Wang, Z, Meirelles, GV, Clark, NR, Ma'ayan, A: Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC bioinformatics*, 14: 128, 2013.
15. Mengel, M, Reeve, J, Bunnag, S, Einecke, G, Jhangri, GS, Sis, B, Famulski, K, Guembes-Hidalgo, L, Halloran, PF: Scoring total inflammation is superior to the current Banff inflammation score in predicting outcome and the degree of molecular disturbance in renal allografts. *Am J Transplant*, 9: 1859-1867, 2009.
- 30 16. Scian, MJ, Maluf, DG, Archer, KJ, Suh, JL, Massey, D, Fassnacht, RC, Whitehill, B, Sharma, A, King, A, Gehr, T, Cotterell, A, Posner, MP, Mas, V: Gene expression changes are associated with loss of kidney graft function and interstitial fibrosis and tubular atrophy: diagnosis versus prediction. *Transplantation*, 91: 657-665, 2011.
17. Meas-Yedid, V, Servais, A, Noel, LH, Panterne, C, Landais, P, Herve, N, Brousse, N, Kreis, H, Legendre, C, Thervet, E, Olivo-Marin, JC, Morelon, E: New computerized color image analysis for the quantification of interstitial fibrosis in renal transplantation. *Transplantation*, 92: 890-899, 2011.
- 35 18. Loupy, A, Suberbielle-Boissel, C, Hill, GS, Lefaucheur, C, Anglicheau, D, Zuber, J, Martinez, F, Thervet, E, Mejean, A, Charron, D, Duong van Huyen, JP, Bruneval, P, Legendre, C, Nochy, D: Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am J Transplant*, 9: 2561-2570, 2009.
- 40 19. Villeda, SA, Plambeck, KE, Middeldorp, J, Castellano, JM, Mosher, KI, Luo, J, Smith, LK, Bieri, G, Lin, K, Berdnik, D, Wabl, R, Udeochu, J, Wheatley, EG, Zou, B, Simmons, DA, Xie, XS, Longo, FM, Wyss-Coray, T: Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nature medicine*, 2014.
20. Mengel, M, Chang, J, Kayser, D, Gwinner, W, Schwarz, A, Einecke, G, Broecker, V, Famulski, K, de Freitas, DG, Guembes-Hidalgo, L, Sis, B, Haller, H, Halloran, PF: The molecular phenotype of 6-week protocol biopsies from human renal allografts: reflections of prior injury but not future course. *Am J Transplant*, 11: 708-718, 2011.
- 45 21. Vitalone, MJ, O'Connell, PJ, Wavamunno, M, Fung, CL, Chapman, JR, Nankivell, BJ: Transcriptome changes of chronic tubulointerstitial damage in early kidney transplantation. *Transplantation*, 89: 537-547, 2010.
22. Maluf, DG, Mas, VR, Archer, KJ, Yanek, K, Gibney, EM, King, AL, Cotterell, A, Fisher, RA, Posner, MP: Molecular pathways involved in loss of kidney graft function with tubular atrophy and interstitial fibrosis. *Molecular medicine*, 14: 276-285, 2008.
- 50 23. Condamine, T, Le Texier, L, Howie, D, Lavault, A, Hill, M, Halary, F, Cobbold, S, Waldmann, H, Cuturi, MC, Chiffolleau, E: Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *Journal of leukocyte biology*, 88: 507-515, 2010.

24. Segovia, M, Louvet, C, Charnet, P, Savina, A, Tilly, G, Gautreau, L, Carretero-Iglesia, L, Beriou, G, Cebrian, I, Cens, T, Hepburn, L, Chiffolleau, E, Floto, RA, Anegon, I, Amigorena, S, Hill, M, Cuturi, MC: Autologous dendritic cells prolong allograft survival through tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 14: 1021-1031, 2014.
25. Viklicky, O, Krystufkova, E, Brabcova, I, Sekerkova, A, Wohlfahrt, P, Hribova, P, Wohlfahrtova, M, Sawitzki, B, Slatinska, J, Striz, I, Volk, HD, Reinke, P: B-cell-related biomarkers of tolerance are up-regulated in rejection-free kidney transplant recipients. *Transplantation*, 95: 148-154, 2013.
26. Zhang, Y, Zong, HT, Yang, CC, Zhang, XD: The clinical implication of inhibiting platelet activation on chronic renal allograft dysfunction: a prospective cohort study. *Transplantation proceedings*, 43: 2596-2600, 2011.
27. Sellares, J, de Freitas, DG, Mengel, M, Sis, B, Hidalgo, LG, Matas, AJ, Kaplan, B, Halloran, PF: Inflammation lesions in kidney transplant biopsies: association with survival is due to the underlying diseases. *Am J Transplant*, 11: 489-499, 2011.
28. Zeeberg, BR, Feng, W, Wang, G, Wang, MD, Fojo, AT, Sunshine, M, Narasimhan, S, Kane, DW, Reinhold, WC, Lababidi, S, Bussey, KJ, Riss, J, Barrett, JC, Weinstein, JN: GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol*, 4, 2003.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de predicción de alteraciones del injerto en un paciente trasplantado de riñón, que comprende una etapa de determinación de los niveles de expresión de genes de proteína bactericida/aumento de la permeabilidad (BPI), ligando 1 de la quimiocina (motivo C) (XCL1) y 3 que contiene el dominio de tiorredoxina (TXNDC3) en una muestra biológica obtenida de dicho paciente trasplantado de riñón.
2. El método según la reivindicación 1, que comprende además una etapa de comparación de dichos niveles de expresión con sus respectivos niveles de referencia predeterminados, en el que una disminución en los niveles de expresión de los genes de BPI, XCL1 y TXNDC3 es predictiva de alteraciones del injerto.
- 10 3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dichas alteraciones del injerto son fibrosis intersticial y atrofia tubular (IFTA), IFTA inflamatoria y lesiones aloinmunes.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha muestra biológica es una muestra de orina o una muestra de sangre.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha muestra biológica se obtiene 3 meses después del trasplante.
- 15 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los niveles de expresión de los genes de BPI, XCL1 y TXNDC3 se determinan midiendo la cantidad de transcritos de ácido nucleico (ARNm) de dichos genes.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los niveles de expresión de los genes de BPI, XCL1 y TXNDC3 se determinan midiendo la cantidad de proteína codificada por dichos genes.
- 20 8. Un kit apropiado para realizar los métodos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho kit comprende reactivos selectivos para medir los niveles de expresión de los genes de BPI, XCL1 y TXNDC3.
9. Uso de un kit que comprende reactivos selectivos para medir los niveles de expresión de los genes de BPI, XCL1 y TXNDC3 para realizar los métodos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 25 10. El kit según la reivindicación 8 o el uso según la reivindicación 9, en el que dichos reactivos selectivos para medir los niveles de expresión de los genes de BPI, XCL1 y TXNDC3 son cebadores y/o sondas de ácido nucleico específicos para dichos genes.
11. El kit según la reivindicación 8 o el uso según la reivindicación 9, en el que dichos reactivos selectivos para medir los niveles de expresión de los genes de BPI, XCL1 y TXNDC3 son anticuerpos o aptámeros que se unen específicamente a proteínas codificadas por dichos genes.

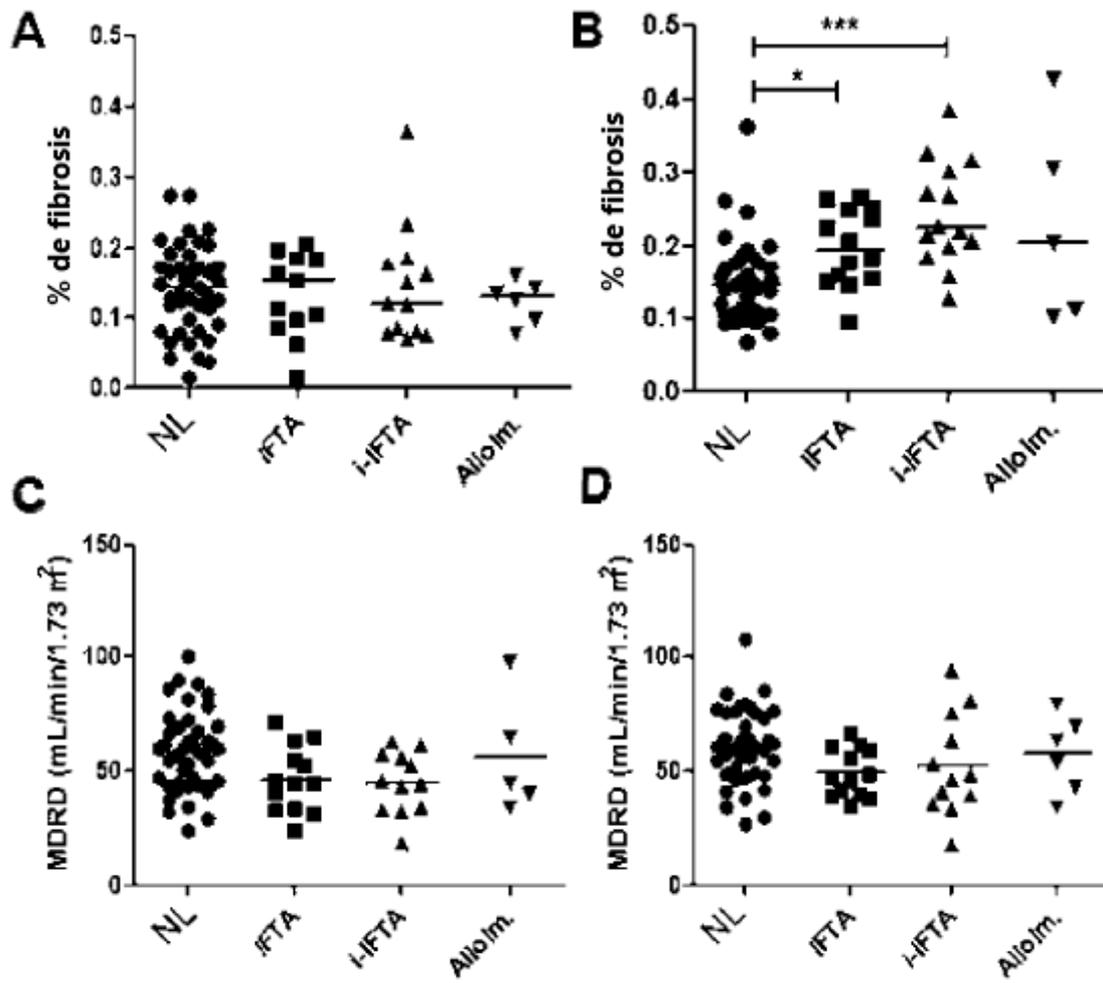


Figura 1

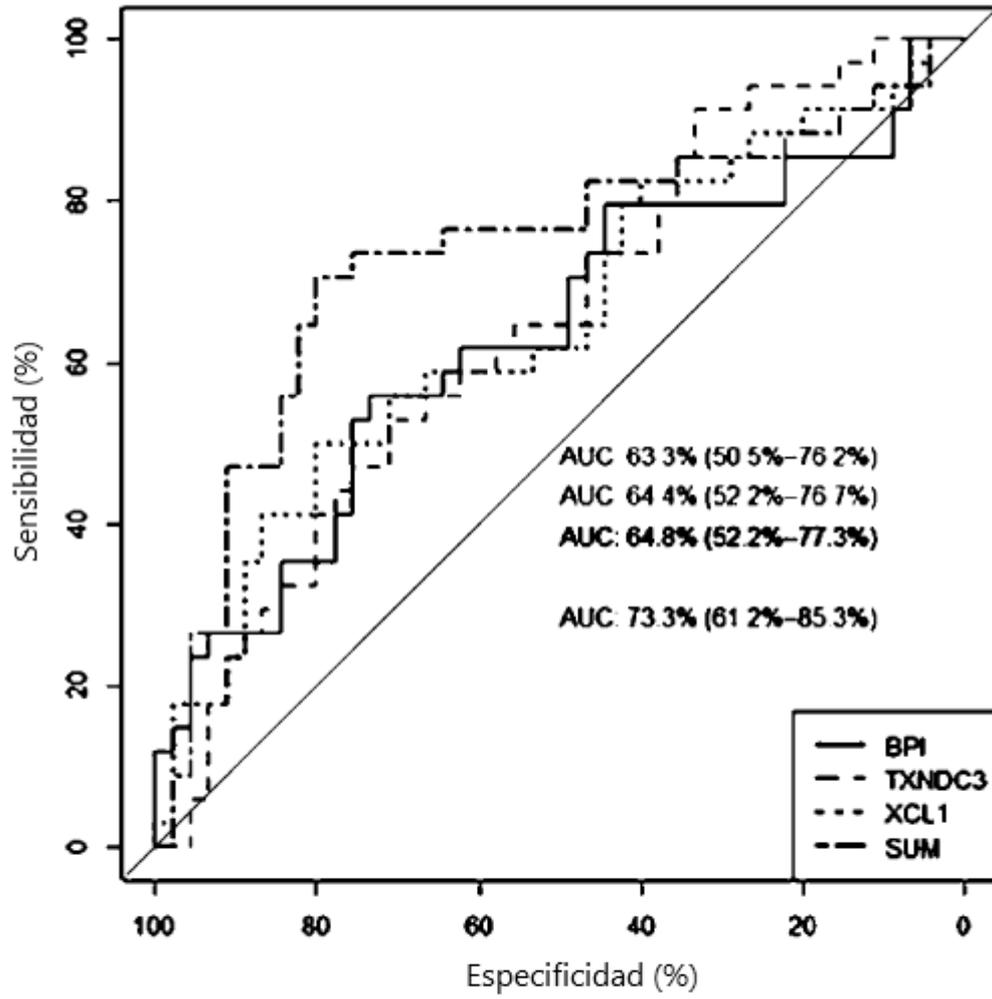


Figura 2

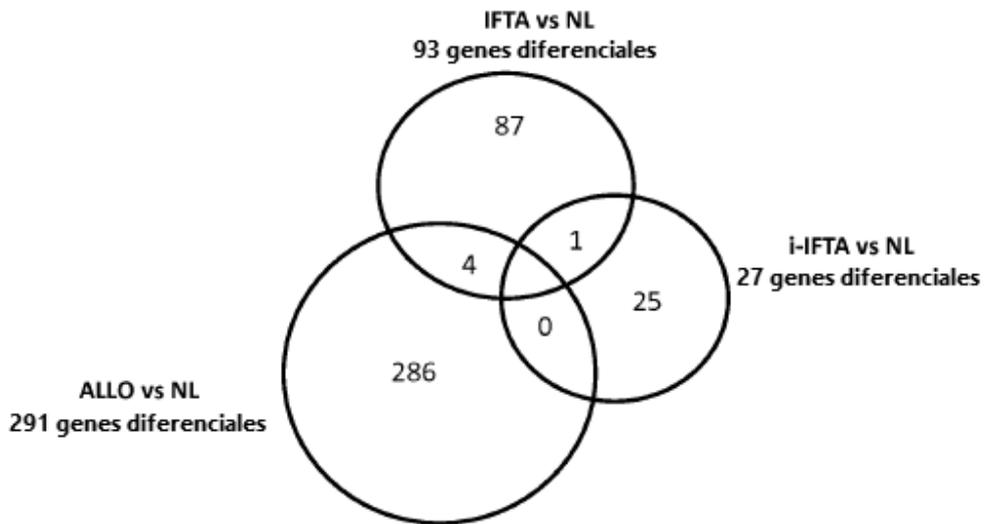


Figura 3

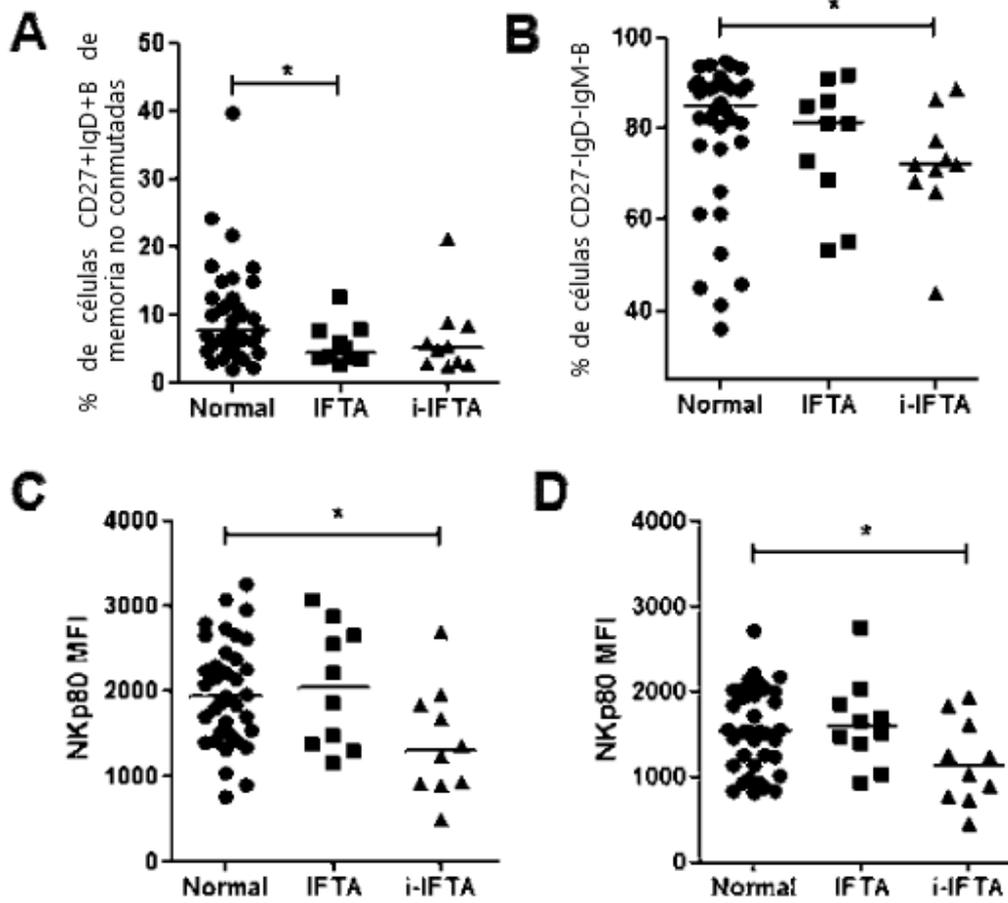


Figura 4