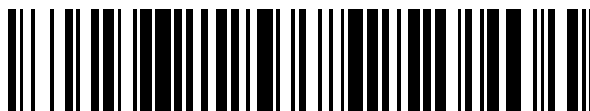


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 114**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6809 (2008.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2011 E 14168535 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 2803735**

54 Título: **Biomarcadores de proteínas y de genes para el rechazo de trasplantes de órganos**

30 Prioridad:

25.03.2010 US 341071 P

14.03.2011 US 201161452288 P

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

09.12.2020

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
Office of the General Counsel, Building 170, Third
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**SARWAL, MINNIE M.;
LI, LI;
SIGDEL, TARA;
KAUSHAL, AMIT;
XIAO, WENZHONG;
BUTTE, ATUL J. y
KHATRI, PURVESH**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 798 114 T3

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

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores de proteínas y de genes para el rechazo de trasplantes de órganos

5 **Derechos gubernamentales**

La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno en virtud de los contratos RR018522, P01 CA049605 y P01 HL075462 otorgados por los National Institutes of Health. El gobierno tiene ciertos derechos en la presente invención.

10

Antecedentes

El trasplante de un órgano o tejido de injerto de un donante a un paciente hospedador es una característica de ciertos procedimientos médicos y protocolos de tratamiento. A pesar de los esfuerzos para evitar el rechazo del injerto a través del emparejamiento del tipo de tejido donante-hospedador, en los procedimientos de trasplante en los que se introduce un órgano donante en un hospedador, generalmente se requiere terapia inmunosupresora para mantener la viabilidad del órgano donante en el hospedador. Sin embargo, a pesar del amplio uso de la terapia inmunosupresora, puede producirse el rechazo del trasplante de órganos.

15

El rechazo agudo del injerto (AR) del tejido de aloinjerto es una respuesta inmunitaria compleja que implica el reconocimiento de las células T del aloantígeno en el aloinjerto, señales coestimuladoras, elaboración de moléculas efectoras por las células T activadas, y una respuesta inflamatoria dentro del injerto. La activación y el reclutamiento de leucocitos circulantes al aloinjerto es una característica central de este proceso. Es importante comprender las vías críticas reguladas en el AR, y si existen similitudes intrínsecas en los mecanismos moleculares de rechazo a través de diferentes trasplantes de órganos sólidos (por ejemplo, riñón, corazón, hígado, pulmón, intestino, páncreas, etc.).

20

25

El documento WO 2010/083121 describe métodos para predecir el rechazo agudo del injerto (AR) determinando, en una muestra de sangre, el nivel de expresión de por lo menos un gen seleccionado de CFLAR, RNF-130, IFNGR1, ITGAX o RYBP, y adicionalmente de NKTR, MAPK9, DUSP1, PBEF1 (asimismo llamado NAMPT) y PSEN1, en el que el injerto es riñón o corazón. Pero el documento no describe el SLC25A37 como un marcador genético.

30

La detección temprana del AR es una de las principales preocupaciones clínicas en la atención de los receptores de trasplantes. La detección del AR antes del inicio de la disfunción del injerto permite el tratamiento exitoso de esta afección con inmunosupresión agresiva. Es igualmente importante reducir la inmunosupresión en pacientes que no tienen AR, para minimizar la toxicidad del fármaco.

35

En consecuencia, las técnicas para monitorizar una respuesta del AR en un receptor de trasplante, incluyendo predecir, diagnosticar y caracterizar el AR, son de interés en el campo. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

40

Sumario de la invención

45 Aspectos de la presente invención según se definen mediante las reivindicaciones adjuntas

Un método para determinar si un sujeto que ha recibido un trasplante de riñón está experimentando una respuesta de rechazo agudo (AR), comprendiendo el método:

50 (a) evaluar un nivel de expresión de uno o más genes en sangre periférica del sujeto, en el que uno o más genes se seleccionan de: SLC25A37, MAP2K3, EPOR, ANK1, CHST11, LYST, RARA, PCTP, ABTB1, y RXRA, en el que SLC25A37 es un gen seleccionado; y

55 (b) determinar si el sujeto está experimentando una respuesta de AR en base al nivel de expresión del uno o más genes seleccionados.

Asimismo se proporcionan composiciones, sistemas, kits y productos de programas de ordenador que se usan en la práctica de los presentes métodos. Los métodos y composiciones encuentran uso en una variedad de aplicaciones.

60

En algunas formas de realización, la presente descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de rechazo agudo (AR) (u otra lesión de injerto, por ejemplo lesión crónica de aloinjerto (CAI)) en la que el valor predictivo positivo (PPV) es mayor que 60, 70, 80, 90, 95 o 99.9%. En algunas formas de realización, la presente descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR en la que el PPV es igual o mayor que 80%. En algunas formas de realización, la descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que

65

ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR en la que el valor predictivo negativo (NPV) es mayor que 60, 70, 80, 90, 95 o 99.9%. En algunas formas de realización, la descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR en la que el NPV es mayor que 80%.

5 En algunas formas de realización, la descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR (u otra lesión de injerto, por ejemplo CAI) en la que la especificidad positiva es mayor que 60, 70, 80, 90, 95 o 99.9%. En algunas formas de realización, la descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR en la que la especificidad es igual o mayor que 80%. En algunas formas de realización, la descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR en la que la sensibilidad es mayor que 60, 70, 80, 90, 95 o 99.9%. En algunas formas de realización, la descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR en la que la sensibilidad es mayor que 80%.

15 En algunas formas de realización, la descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR (u otra lesión de injerto, por ejemplo CAI) en la que el valor de ROC es mayor que 60, 70, 80, 90, 95, o 99.9%. En algunas formas de realización, la descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR en la que el valor de ROC es mayor que 70%. En algunas formas de realización, la descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR en la que el valor de ROC es mayor que 80%. En algunas formas de realización, la descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR en la que el valor de ROC es mayor que 90%.

25 En algunas formas de realización, el valor p en el análisis de los métodos descritos en la presente memoria está por debajo de 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.009, 0.005, o 0.001. En algunas formas de realización, el valor p está por debajo de 0.001. De este modo, en algunas formas de realización, la descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR en la que el valor p está por debajo de 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.009, 0.005, o 0.001. En algunas formas de realización, el valor p está por debajo de 0.001. En algunas formas de realización, la descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR en la que el valor de AUC es mayor que 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 o 0.9. En algunas formas de realización, la descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR en la que el valor de AUC es mayor que 0.7. En algunas formas de realización, la descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR en la que el valor de AUC es mayor que 0.8. En algunas formas de realización, la descripción proporciona métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de AR en la que el valor de AUC es mayor que 0.9.

40 Definiciones

Por conveniencia, se recopilan en la presente memoria ciertos términos utilizados en la memoria descriptiva, ejemplos, y reivindicaciones adjuntas.

45 El "rechazo agudo o AR" es el rechazo por el sistema inmunitario de un receptor de trasplante de tejido cuando el tejido trasplantado es inmunológicamente extraño. El rechazo agudo se caracteriza por la infiltración del tejido trasplantado por células inmunitarias del receptor, que llevan a cabo su función efectora y destruyen el tejido trasplantado. El inicio del rechazo agudo es rápido, y generalmente ocurre en seres humanos en unas pocas semanas después de la cirugía de trasplante. En general, el rechazo agudo puede inhibirse o suprimirse con fármacos inmunosupresores como rapamicina, ciclosporina A, anticuerpo monoclonal anti-CD40L, y similares.

55 El "rechazo o lesión crónica del trasplante" o "CAI" generalmente ocurre en seres humanos dentro de varios meses o años después del injerto, incluso en presencia de inmunosupresión exitosa del rechazo agudo. La fibrosis es un factor común en el rechazo crónico de todos los tipos de trasplantes de órganos. El rechazo crónico generalmente puede describirse por un intervalo de trastornos específicos que son característicos del órgano particular. Por ejemplo, en trasplantes de pulmón, tales trastornos incluyen la destrucción fibroproliferativa de las vías respiratorias (bronquiolitis obliterante); en trasplantes de corazón o trasplantes de tejido cardíaco, tales como reemplazos valvulares, tales trastornos incluyen aterosclerosis fibrótica; en trasplantes de riñón, tales trastornos incluyen nefropatía obstructiva, nefroesclerosis, nefropatía tubulointersticial; y en los trasplantes de hígado, tales trastornos incluyen el síndrome de conductos biliares evanescentes. El rechazo crónico asimismo puede caracterizarse por ataque isquémico, denervación del tejido trasplantado, hiperlipidemia e hipertensión asociadas con fármacos inmunosupresores.

65 La expresión "rechazo de trasplante" comprende tanto el rechazo agudo como el rechazo crónico de trasplante. La expresión "lesión de trasplante" se refiere a todas las formas de disfunción del injerto, independientemente del

diagnóstico patológico. La expresión “lesión de órgano” se refiere a biomarcadores que se rastrean con una función pobre del órgano, independientemente de que el órgano sea nativo o de un trasplante, e independientemente de la etiología.

5 La expresión “condiciones de ensayo rigurosas”, como se usa en la presente memoria, se refiere a condiciones que son compatibles para producir pares de unión de proteínas, péptidos, anticuerpos y ácidos nucleicos, por ejemplo ácidos nucleicos unidos a la superficie y en fase de disolución, de suficiente complementariedad para proporcionar el nivel deseado de especificidad en el ensayo, mientras que es menos compatible con la formación de pares de unión entre miembros de unión de complementariedad insuficiente para proporcionar la especificidad deseada. Las condiciones de ensayo rigurosas son la suma o combinación (totalidad) de las condiciones tanto de hibridación como de lavado, así como la predicción combinada de la etiología de la lesión, según se infiere por el comportamiento de un marcador mínimamente invasivo o no invasivo, con valores definidos para PPV, NPV, especificidad y sensibilidad.

15 Las “condiciones de hibridación rigurosas” y las “condiciones de lavado de hibridación rigurosas”, en el contexto de la hibridación de ácidos nucleicos (por ejemplo, como en la matriz, hibridaciones Southern o Northern) dependen de la secuencia, y son diferentes bajo diferentes parámetros experimentales. Las condiciones de hibridación rigurosas que pueden usarse para identificar ácidos nucleicos pueden incluir, por ejemplo, hibridación en un amortiguador que comprende formamida al 50%, 5xSSC y 1% de SDS a 42°C, o hibridación en un amortiguador que comprende 5xSSC y 1% de SDS a 65°C, ambos con un lavado de 0.2xSSC y 0.1% de SDS a 65°C. Las condiciones de hibridación rigurosas ejemplificativas asimismo pueden incluir hibridación en un amortiguador de formamida al 40%, NaCl 1 M y SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 1xSSC a 45°C. Alternativamente, se puede emplear la hibridación a ADN unido al filtro en NaHPO₄ 0.5 M, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, EDTA 1 mM a 65°C, y lavado en 0,1xSSC/SDS al 0.1% a 68°C. Aún más, las condiciones de hibridación rigurosas adicionales incluyen la hibridación a 60°C o más y 3xSSC (cloruro de sodio 450 mM/citrato de sodio 45 mM), o la incubación a 42°C en una disolución que contiene formamida al 30%, NaCl 1 M, sarcosina de sodio al 0.5%, MES 50 mM, pH 6.5. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que pueden utilizarse condiciones de hibridación y lavado alternativas pero comparables para proporcionar condiciones de rigurosidad similar.

30 En ciertas formas de realización, la rigurosidad de las condiciones de lavado establece las condiciones que determinan si un ácido nucleico se hibrida específicamente con un ácido nucleico unido a la superficie o con una diana marcada con fluoróforo. Las condiciones de lavado usadas para identificar ácidos nucleicos pueden incluir, por ejemplo: una concentración de sal de alrededor de 0.02 molar a pH 7 y una temperatura de por lo menos alrededor de 50°C o alrededor de 55°C a alrededor de 60°C; o, una concentración de sal de alrededor de 0.15 M de NaCl a 72°C durante alrededor de 15 minutos; o, una concentración de sal de alrededor de 0.2xSSC a una temperatura de por lo menos alrededor de 50°C o alrededor de 55°C a alrededor de 60°C durante alrededor de 15 a alrededor de 20 minutos; o, el complejo de hibridación se lava dos veces con una disolución con una concentración de sal de alrededor de 2xSSC que contiene SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante 15 minutos, y luego se lava dos veces con 0.1xSSC que contiene SDS al 0.1% a 68°C durante 15 minutos; o, condiciones equivalentes. Las condiciones rigurosas para el lavado asimismo pueden ser, por ejemplo, 0.2xSSC/SDS al 0.1% a 42°C.

45 Un ejemplo específico de condiciones de ensayo rigurosas es la hibridación giratoria a 65°C en un amortiguador de hibridación a base de sal con una concentración de catión monovalente total de 1.5 M (por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente US n° 09/655.482, presentada el 5 de septiembre de 2000), seguido de lavados de 0.5xSSC y 0.1xSSC a temperatura ambiente.

50 Las condiciones de ensayo rigurosas son condiciones de hibridación que son por lo menos tan rigurosas como las condiciones representativas anteriores, en las que se considera que un conjunto dado de condiciones es por lo menos tan riguroso si sustancialmente no se producen en el conjunto dado de condiciones complejos de unión adicionales que carecen de complementariedad suficiente para proporcionar la especificidad deseada, en comparación con las condiciones específicas anteriores, en las que “sustancialmente no más” significa menos de alrededor de 5 veces más, típicamente menos de alrededor de 3 veces más. En la técnica se conocen otras condiciones de hibridación rigurosas, y asimismo se pueden emplear, según sea apropiado.

55 Como se usa en la presente memoria, el término “gen” o “gen recombinante” se refiere a un ácido nucleico que comprende un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido, que incluye secuencias de exón y (opcionalmente) intrón. El término “intrón” se refiere a una secuencia de ADN presente en un gen dado que no se traduce en proteína, y generalmente se encuentra entre exones en una molécula de ADN. Además, un gen puede incluir opcionalmente su promotor natural (es decir, el promotor con el cual los exones y los intrones del gen están operablemente enlazados en una célula no recombinante, es decir, una célula natural), y secuencias reguladoras asociadas, y puede tener o no secuencias en dirección 5' del sitio de inicio AUG, y puede incluir o no secuencias líder no traducidas, secuencias de señal, secuencias no traducidas en dirección 3', secuencias de inicio y parada transcripcionales, señales de poliadenilación, secuencias de inicio y parada traduccionales, sitios de unión a ribosomas, y similares.

Una "secuencia codificante de una proteína", o una secuencia que "codifica" un polipéptido o péptido particular, es una secuencia de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) a un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante están determinados por un codón de inicio en el término 5' (amino) y un codón de parada de la traducción en el término 3' (carboxi). Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, ADNc de ARNm viral, procariota o eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN viral, procariota o eucariota, e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción puede ubicarse en 3' con respecto a la secuencia codificante.

Los términos "referencia" y "control" se usan indistintamente para referirse a un valor conocido o conjunto de valores conocidos con los que se puede comparar un valor observado. Como se usa en la presente memoria, conocido significa que el valor representa un parámetro comprendido, por ejemplo un nivel de expresión de un gen marcador en un fenotipo de supervivencia o pérdida de injerto. Un valor de referencia o control puede ser de una sola medida o punto de datos, o puede ser un valor calculado en base a más de una medida o punto de datos (por ejemplo, un promedio de muchas medidas diferentes). Se puede emplear cualquier valor o valores de referencia o control convenientes.

La expresión "ácido nucleico" incluye ADN, ARN (bicatenario o monocatenario), análogos (por ejemplo, moléculas de PNA o LNA) y derivados de los mismos. Las expresiones "ácido ribonucleico" y "ARN", como se usan en la presente memoria, significan un polímero compuesto de ribonucleótidos. Las expresiones "ácido desoxirribonucleico" y "ADN", tal como se usan en la presente memoria, significan un polímero compuesto de desoxirribonucleótidos. El término "ARNm" significa ARN mensajero. Un "oligonucleótido" se refiere generalmente a un multímero de nucleótidos de alrededor de 10 a 100 nucleótidos de longitud, mientras que un "polinucleótido" incluye un multímero de nucleótidos que tiene cualquier número de nucleótidos.

Los términos "proteína", "polipéptido", "péptido", y similares, se refieren a un polímero de aminoácidos (una secuencia de aminoácidos), y no se refieren a una longitud específica de la molécula. Este término asimismo se refiere o incluye cualquier modificación del polipéptido (por ejemplo, postraduccionales), tal como glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, y similares. Se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido, polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural.

El término "cuantificar" y "evaluar" se usan indistintamente para referirse a cualquier forma de medida, e incluye determinar si un elemento está presente o no. Los términos "determinar", "medir", "evaluar" y "analizar" se usan indistintamente e incluyen determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas. La evaluación puede ser relativa o absoluta. "Evaluar la presencia de" incluye determinar la cantidad de algo presente, así como determinar si está presente o ausente.

Los términos "perfil" y "firma" y "resultado" y "datos", y similares, cuando se usan para describir datos de nivel de péptido o nivel de expresión génica, se usan indistintamente (por ejemplo, firma/perfil/resultado/datos de péptido, firma/perfil/resultado/datos de expresión génica, etc.).

Algunas abreviaturas utilizadas en esta solicitud incluyen las siguientes:

AR:	rechazo agudo;
FDR:	tasa de descubrimiento falso;
HC:	control sano (por ejemplo, un receptor sin trasplante);
HPLC:	cromatografía de líquidos de alto rendimiento;
LC:	cromatografía de líquidos (por ejemplo, HPLC);
LC-MS:	cromatografía de líquidos y espectroscopía de masas;
LC-MALDI:	cromatografía de líquidos e ionización por desorción por láser asistida por matriz;
MALDI:	ionización por desorción por láser asistida por matriz;
MS:	espectroscopía de masas
MRM:	monitorización de reacción múltiple
NS:	proteinuria no específica con enfermedades renales nativas; síndrome nefrótico;
PBL:	leucocitos de sangre periférica;
Q-PCR:	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa;
STA:	aloinjerto estable;
WBC:	glóbulo blanco.

Breve descripción de las figuras

Figura 1A, 1B, 1C y 1D: (A) Gráfica que compara el valor de p ajustado por FDR (eje Y) y la diferencia media estandarizada reunida (escala log₂) de los datos de expresión génica del tejido de biopsia de trasplante de órgano sólido. (B) Muestra la red reguladora que se activa durante el AR en función de los datos del perfil de expresión génica a partir del tejido de biopsia de trasplante de órgano sólido (ver la tabla 1 a continuación). (C)

Muestra el log(valor de p) para los 180 genes identificados como significativamente aumentados en los datos de expresión génica de la división de tejido de biopsia de trasplante de órgano sólido según la categoría de gen (enumerados a la izquierda). Las barras indican el valor de p de los genes específicos, y la línea representa la relación. (D) Muestra una tabla del número de genes específicos de tejido sobreexpresados en tejido de biopsia de trasplante de órgano sólido, valores de P, y valores de FDR.

Las figuras 2A-2B ilustran la predicción de la muestra de cGvHD basada en un conjunto de 10 genes. (A) conjunto de 10 genes derivados de la comparación de muestras de cGvHD activa y de cGvHD inactiva seleccionadas aleatoriamente en un conjunto de entrenamiento realizado por Análisis Estadístico de Micromatrices y Análisis Predictivo de Micromatrices. Las predicciones de cGvHD inactiva se muestran en color gris, y las predicciones de cGvHD activa se muestran en color negro. (B) probabilidades de predicción del conjunto de 10 genes basadas en el modelo de regresión logística multinomial de muestras de cGvHD en el último seguimiento.

Figura 3. Se identificaron proteínas urinarias de la orina recogida de pacientes sanos y renales, con o sin trasplante de riñón. Número de proteínas identificadas en la orina recogida de pacientes con trasplante renal con rechazo agudo (AR) probado por biopsia, pacientes con trasplante renal con función de injerto estable (STA), control sano (HC), y pacientes renales con síndrome nefrótico (NS).

Figura 4. Se observó un enriquecimiento significativo de proteínas extracelulares y de la membrana plasmática en orina. Presentación en gráfico circular de proteínas de distribución en términos de ubicación celular (citoplasmática, extracelular, nuclear y de membrana plasmática, y desconocida). (A) Distribución en proteoma humano basada en datos del genoma humano. (B) Las proteínas de distribución identificadas en este estudio.

Figura 5. Un mapa de calor que demuestra el nivel de proteínas elevadas en AR en comparación con STA en comparación con orina sana y NS.

Figura 6. Verificación del descubrimiento de posibles candidatos a biomarcadores por ensayo ELISA. El nivel de proteína urinaria de tres proteínas candidatas, THP, PEDF, y CD44, se midió por ELISA usando un conjunto independiente de muestras de diferentes fenotipos. (A) Se observó una disminución del nivel de THP en la orina AR (n = 20, concentración media 5.50 µg/ml) en comparación con la orina STA (n = 20, concentración media 13.95 µg/ml) con P <0.01 y orina de control sano (n = 20, concentración media 19.80 µg/ml) con P <0.001. (B) Se observó un mayor nivel de proteína PEDF en orina AR (n = 20, concentración media 0.40 µg/ml) en comparación con orina STA (n = 20, concentración media 0.01 µg/ml) con P = 0.0001, con orina de control sano (n = 8, concentración media 0.01 µg/ml) con P = 0.02, y con orina de síndrome nefrótico (n = 6, concentración media 0.02 µg/ml) con P = 0.005. (C) Se observó una disminución del nivel de proteína CD44 en la orina AR (n = 20, concentración media 1.67 ng/ml) en comparación con orina STA (n = 20, concentración media 12.57 ng/ml) con P <0,00001, con orina de control sano (n = 6, concentración media 11.76 ng/ml) con P <0.02, y con orina de síndrome nefrótico (n = 6, concentración media 8.54 ng/ml) con P <0.0002. Los cuadros en las gráficas de cuadro están delimitados por los percentiles 75 y 25 de los datos, y los bigotes se extienden hasta los valores mínimo y máximo.

Figura 7. Se compararon las proteínas urinarias identificadas de diferentes grupos de pacientes, incluidos los controles sanos (HC). [A] Un diagrama de Venn para comparar proteínas urinarias de individuos normales sanos identificados en este estudio con las proteínas identificadas por Adachi et al. (Genome Biol 2006, 7, (9), R80) y proteínas urinarias identificadas por Gonzalez, et al. (J Am Soc Nephrol 2008). [B] Una comparación de proteínas identificadas en orina sana (HC) y orina de síndrome nefrótico (NS). [C] Una comparación de proteínas identificadas en orina sana (HC) y orina de pacientes con trasplante renal, tanto de injerto estable (STA) como de rechazo agudo (AR) combinados. [D] Una comparación de proteínas identificadas en orina de injerto estable (STA) con orina de rechazo agudo (AR).

Descripción de las formas de realización específicas

Debe apreciarse que la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir formas de realización particulares solamente, y no pretende ser limitativo, ya que el alcance de la presente invención está limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor señalado o intermedio en ese intervalo señalado. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo señalado. Cuando el intervalo señalado incluye uno o ambos límites, los intervalos excluyen uno o ambos de esos límites incluidos.

Ciertos intervalos se presentan en la presente memoria con valores numéricos precedidos por el término "alrededor de". La expresión "alrededor de" se usa en la presente memoria para proporcionar soporte literal para el número

exacto que precede, así como un número que está cerca de o aproximadamente del número que precede al término. Al determinar si un número está cerca de o aproximadamente de un número específicamente citado, el número no citado cercano o aproximado puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporciona el equivalente sustancial del número específicamente citado.

5

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria asimismo se puede usar en la práctica o ensayo de la presente descripción, se describen métodos y materiales ilustrativos.

10

Se observa que, como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración tiene la intención de servir como base antecedente para el uso de una terminología exclusiva como “únicamente”, “solo”, y similares, en relación con la cita de elementos de reivindicación, o el uso de una limitación “negativa”.

15

Como será evidente para los expertos en la materia a partir de la presente descripción, cada una de las formas de realización individuales descritas e ilustradas en la presente memoria presenta unos componentes y unas características discretas que pueden separarse fácilmente o combinarse con las características de cualquiera de las otras formas de realización sin apartarse del alcance o espíritu de la presente invención. Cualquier método mencionado se puede llevar a cabo en el orden de los eventos citados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

20

25

Los aspectos de la presente descripción proporcionan métodos para determinar una categoría de trasplante clínico de un sujeto que ha recibido un trasplante de órgano. La mayor adopción de perfiles transcripcionales de biopsias de trasplante ha proporcionado conocimientos útiles sobre los mecanismos de lesión de aloinjerto, tal como el rechazo agudo (AR) y la lesión crónica de aloinjerto (CAI). Como resultado de estos conocimientos, se ha planteado la hipótesis de que existe un mecanismo de rechazo común en todos los órganos sólidos trasplantados (Wang et al., Trends in Immunology, v. 29, Edición 6, junio 2008, páginas 256-262), según lo identificado asimismo recientemente por nuestro grupo, mediante el cual biomarcadores séricos identifican AR en trasplantes tanto renales como cardíacos con especificidad y sensibilidad elevadas (Chen, et al., 2010 PLOS v. 6 (9), e1000940). La identificación de tal mecanismo de rechazo común puede generar beneficios a largo plazo. Por ejemplo, puede facilitar diagnósticos y terapias novedosas sin requerir la comprensión de lesiones individuales específicas de tejido.

30

35

Se desarrolla un método novedoso para el metanálisis de perfiles de expresión génica de tejido de biopsia de trasplantes de órganos sólidos trasplantados para encontrar vías comunes reguladas en AR, independientemente de la fuente de tejido. El presente método combina dos tipos de evidencias: (1) cantidad de cambio en la expresión en todos los estudios (*tamaño del efecto meta*) y (2) significancia estadística del cambio en cada estudio (*valor meta p*). Se descargan ocho conjuntos de datos de dominio público correspondientes a corazón, pulmón, hígado y riñón. Cada conjunto de datos se seleccionó manualmente para el control de calidad. Se identificaron 180 genes significativamente sobreexpresados en todos los conjuntos de datos usando el tamaño del efecto meta, y 1772 genes usando el valor meta p. Hubo 102 genes que fueron significativos por ambos métodos (Tabla 1).

40

45

Tabla 1: 102 genes regulados por rutas comunes en AR de trasplante de órgano sólido

Símbolo del gen	Nº de	Tamaños de los efectos combinados					Valores p combinados				
		Tamaño de meta-efecto	Tamaño de meta-efecto (Error est.)	Valor p	FDR	Valor F (arriba)	Valor p (arriba)	FDR (arriba)	Valor F (abajo)	Valor p (abajo)	FDR (abajo)
CXCL9	8	1.229	0.312	8.26E-05	1.35E-02	53.847	5.49E-06	6.58E-01	1.000	4.61E-03	1.00E+00
CD7	8	1.201	0.309	0.000104	1.55E-02	68.901	1.55E-08	9.45E-01	1.000	2.94E-05	1.00E+00
CORO1A	8	1.192	0.335	0.000376	3.60E-02	63.857	1.16E-07	1.12E+00	1.000	1.64E-04	1.00E+00
PSMB9	8	1.175	0.283	3.34E-05	7.79E-03	61.270	3.19E-07	8.51E-02	1.000	3.88E-04	1.00E+00
NKG7	8	1.158	0.294	8.29E-05	1.35E-02	57.689	1.28E-06	1.72E+00	1.000	1.39E-03	1.00E+00
ARPC1B	8	1.149	0.349	0.001001	6.39E-02	52.732	8.34E-06	4.24E-04	1.000	6.26E-03	1.00E+00
CD2	8	1.130	0.346	0.001097	6.77E-02	64.395	9.36E-08	9.75E-01	1.000	1.37E-04	1.00E+00
TAP1	8	1.103	0.277	6.94E-05	1.17E-02	55.928	2.50E-06	4.90E-01	1.000	2.47E-03	1.00E+00
INPP5D	8	1.095	0.266	3.92E-05	8.51E-03	71.588	5.25E-09	4.24E-04	1.000	1.22E-05	1.00E+00
ISG20	8	1.073	0.238	6.69E-06	2.65E-03	57.863	1.19E-06	4.24E-04	1.000	1.33E-03	1.00E+00
BATF	8	1.061	0.319	0.000874	5.87E-02	55.916	2.51E-06	9.26E-02	1.000	2.47E-03	1.00E+00
PTPRCAP	8	1.035	0.324	0.001424	7.86E-02	57.262	1.50E-06	3.42E-01	1.000	1.57E-03	1.00E+00
RUNX3	8	1.006	0.212	2.12E-06	1.19E-03	41.157	0.000526	2.25E-01	1.000	1.62E-01	1.00E+00
GZMK	8	1.001	0.242	3.41E-05	7.88E-03	45.118	0.000133	4.24E-04	1.000	5.57E-02	1.00E+00
ZAP70	8	0.968	0.235	3.67E-05	8.22E-03	54.265	4.69E-06	1.97E+00	1.000	4.08E-03	1.00E+00
ARHGAP4	8	0.960	0.252	0.000142	1.92E-02	42.045	0.000389	2.96E-01	1.000	1.28E-01	1.00E+00
IRF3	8	0.946	0.304	0.001843	9.18E-02	46.325	8.67E-05	4.24E-04	1.000	4.03E-02	1.00E+00
GZMA	8	0.945	0.270	0.000461	4.04E-02	40.402	0.00068	2.25E+00	1.000	1.92E-01	1.00E+00
UCP2	8	0.944	0.217	1.32E-05	3.96E-03	38.571	0.001254	4.24E-04	1.000	2.86E-01	1.00E+00
CD3D	8	0.941	0.242	9.92E-05	1.53E-02	35.819	0.003066	5.34E-01	1.000	5.34E-01	1.00E+00
HLA-DMA	8	0.939	0.326	0.003944	1.38E-01	51.744	1.20E-05	8.60E-01	1.000	8.54E-03	1.00E+00

LGALS9	8	0.927	0.344	0.006984	1.84E-01	45.441	0.000119	1.15E+00	1.000	5.32E-02	1.00E+00
CD53	8	0.904	0.201	7.02E-06	2.76E-03	35.002	0.003971	4.24E-04	1.000	6.28E-01	1.00E+00
ARHGDI8	8	0.904	0.331	0.006314	1.76E-01	53.039	7.43E-06	1.65E+00	1.000	5.75E-03	1.00E+00
C1orf38	8	0.895	0.305	0.003375	1.28E-01	43.272	0.000254	7.99E-01	1.000	9.34E-02	1.00E+00
ITGB7	8	0.888	0.169	1.43E-07	1.57E-04	33.970	0.005485	4.24E-04	1.000	7.69E-01	1.00E+00
MAP4K1	8	0.885	0.273	0.001196	7.10E-02	52.749	8.29E-06	3.02E+00	1.000	6.26E-03	1.00E+00
STAT1	8	0.885	0.294	0.002624	1.12E-01	59.812	5.63E-07	3.23E+00	1.000	6.53E-04	1.00E+00
MCM5	8	0.876	0.248	0.000402	3.76E-02	36.392	0.002551	4.24E-04	1.000	4.79E-01	1.00E+00
CD8A	8	0.870	0.237	0.000238	2.69E-02	34.414	0.004776	4.24E-04	1.000	7.07E-01	1.00E+00
STAB1	8	0.868	0.221	8.69E-05	1.38E-02	41.085	0.000539	8.53E-01	1.000	1.62E-01	1.00E+00
LCK	8	0.862	0.242	0.000358	3.49E-02	54.433	4.41E-06	1.45E+01	0.563	3.95E-03	1.00E+00
CXCL10	8	0.848	0.182	3.36E-06	1.60E-03	32.039	0.009883	6.45E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
TNFRSF14	8	0.840	0.201	2.90E-05	7.09E-03	30.426	0.015915	4.24E-04	1.000	1.00E+00	1.00E+00
HCP5	8	0.838	0.293	0.004158	1.42E-01	39.859	0.000816	1.88E+00	1.000	2.15E-01	1.00E+00
ITGB2	8	0.833	0.310	0.007245	1.88E-01	45.578	0.000113	2.30E+00	1.000	5.14E-02	1.00E+00
CD14	8	0.832	0.305	0.006381	1.77E-01	43.655	0.000222	1.44E+00	1.000	8.42E-02	1.00E+00
IL2RB	8	0.829	0.228	0.00028	3.01E-02	29.630	0.02002	8.86E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
HLA-F	8	0.807	0.225	0.000345	3.43E-02	51.399	1.37E-05	2.56E+00	1.000	9.32E-03	1.00E+00
BASP1	8	0.804	0.167	1.56E-06	9.35E-04	30.693	0.014722	3.48E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
PLCB2	8	0.804	0.273	0.003267	1.26E-01	42.496	0.000333	8.53E-01	1.000	1.12E-01	1.00E+00
CASP4	8	0.798	0.239	0.000824	5.68E-02	35.774	0.00311	5.36E-01	1.000	5.39E-01	1.00E+00
LEF1	8	0.798	0.238	0.000807	5.64E-02	36.687	0.00232	1.56E+00	1.000	4.45E-01	1.00E+00
IL10RA	8	0.795	0.224	0.00039	3.68E-02	35.849	0.003036	1.69E-01	1.000	5.33E-01	1.00E+00
TNFRSF9	8	0.791	0.217	0.000275	2.97E-02	26.157	0.051864	2.92E-02	1.000	1.00E+00	1.00E+00
FCER1G	8	0.782	0.271	0.00395	1.38E-01	35.161	0.003777	1.88E-01	1.000	6.10E-01	1.00E+00
FOXM1	8	0.778	0.229	0.000665	4.98E-02	22.084	0.1405	1.04E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
BIRC5	8	0.776	0.207	0.000175	2.22E-02	40.910	0.000572	1.16E+00	1.000	1.70E-01	1.00E+00
MMP9	8	0.775	0.259	0.002778	1.15E-01	35.180	0.003755	6.42E-01	1.000	6.09E-01	1.00E+00

F13A1	8	0.766	0.200	0.000132	1.83E-02	30.632	0.01499	4.24E-04	1.000	1.00E+00	1.00E+00
MDK	8	0.765	0.249	0.002154	9.94E-02	26.177	0.051586	2.42E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
GBP2	8	0.762	0.234	0.001121	6.84E-02	27.116	0.040211	1.03E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
CD6	8	0.753	0.215	0.000464	4.04E-02	39.122	0.001044	2.07E+00	1.000	2.55E-01	1.00E+00
TNFRSF1B	8	0.751	0.198	0.000147	1.98E-02	28.599	0.026782	5.70E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
TNFRSF1A	8	0.749	0.222	0.000731	5.32E-02	26.312	0.049799	5.94E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
AIM2	8	0.743	0.142	1.55E-07	1.65E-04	25.794	0.056994	4.24E-04	1.000	1.00E+00	1.00E+00
IL15RA	8	0.736	0.138	9.45E-08	1.19E-04	33.091	0.007187	2.13E+00	1.000	9.34E-01	1.00E+00
CDC20	8	0.723	0.251	0.003916	1.38E-01	22.419	0.130169	5.73E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
IRF1	8	0.719	0.238	0.002481	1.08E-01	29.262	0.022231	2.46E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
STK10	8	0.716	0.187	0.000134	1.84E-02	31.919	0.010244	4.24E-04	1.000	1.00E+00	1.00E+00
CD48	8	0.708	0.266	0.007784	1.95E-01	25.220	0.066041	1.63E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
TNF	8	0.704	0.237	0.002968	1.20E-01	31.268	0.012433	2.41E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
ATF5	8	0.701	0.175	6.26E-05	1.11E-02	36.291	0.002636	6.27E-01	1.000	4.88E-01	1.00E+00
IKBKE	8	0.691	0.242	0.004354	1.45E-01	31.706	0.010918	1.22E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
PLEK	8	0.690	0.218	0.001566	8.35E-02	27.884	0.032647	4.19E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
ADAM8	8	0.689	0.214	0.001282	7.36E-02	35.151	0.003789	8.53E-01	1.000	6.10E-01	1.00E+00
HLA-G	8	0.679	0.137	6.81E-07	5.35E-04	32.896	0.007628	4.24E-04	1.000	9.71E-01	1.00E+00
SH2D2A	8	0.676	0.190	0.000375	3.60E-02	23.935	0.090924	1.01E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
RGS10	8	0.674	0.187	0.000305	3.18E-02	31.568	0.011376	8.53E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
BTN3A2	8	0.667	0.173	0.00012	1.71E-02	28.853	0.024945	2.34E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
DDB2	8	0.661	0.215	0.002064	9.69E-02	21.512	0.159646	4.24E-04	1.000	1.00E+00	1.00E+00
HLA-A	8	0.656	0.209	0.001674	8.70E-02	31.862	0.010422	1.52E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
HLA-E	8	0.652	0.201	0.001153	6.94E-02	36.028	0.002868	1.67E+00	1.000	5.14E-01	1.00E+00
AIF1	8	0.637	0.222	0.004096	1.41E-01	30.397	0.01605	1.03E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
IFITM3	8	0.633	0.134	2.19E-06	1.20E-03	24.210	0.085024	8.70E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
PTPRC	8	0.627	0.226	0.005395	1.62E-01	31.976	0.010071	3.53E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
MAN2B1	8	0.625	0.236	0.008117	1.99E-01	22.819	0.11866	9.47E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00

DDX23	8	0.624	0.206	0.002394	1.06E-01	26.682	0.045157	6.91E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
MARCKS	8	0.616	0.141	1.34E-05	3.99E-03	23.679	0.096749	3.09E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
PSME1	8	0.615	0.219	0.004918	1.55E-01	21.765	0.150949	7.10E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
HLA-DQB1	8	0.601	0.194	0.001989	9.55E-02	37.930	0.001548	1.14E+01	0.786	3.34E-01	1.00E+00
RAB27A	8	0.601	0.109	3.70E-08	6.30E-05	22.793	0.119394	5.36E-02	1.000	1.00E+00	1.00E+00
BBC3	8	0.597	0.185	0.001249	7.27E-02	22.702	0.121927	2.92E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
POLR2A	8	0.594	0.224	0.007933	1.97E-01	31.439	0.011821	1.65E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
ADAM19	8	0.593	0.180	0.001003	6.39E-02	25.667	0.0589	8.53E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
NELL2	8	0.580	0.207	0.005007	1.57E-01	20.796	0.186499	7.43E-02	1.000	1.00E+00	1.00E+00
NNMT	8	0.569	0.209	0.006481	1.78E-01	21.213	0.170483	7.99E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
NUP210	8	0.569	0.194	0.003416	1.29E-01	31.018	0.013383	8.53E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
VAMP5	8	0.533	0.156	0.000645	4.88E-02	21.575	0.157461	1.90E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
IRF4	8	0.523	0.192	0.006448	1.78E-01	28.682	0.026169	1.96E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
SERPINH1	8	0.514	0.166	0.002007	9.55E-02	32.862	0.007709	2.66E-01	1.000	9.73E-01	1.00E+00
TNFAIP2	8	0.511	0.166	0.00201	9.55E-02	22.853	0.117733	2.01E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
MAP3K11	8	0.508	0.144	0.000436	3.91E-02	23.248	0.107276	3.97E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
PRKD2	8	0.496	0.141	0.000414	3.81E-02	20.921	0.181558	3.53E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
CCL13	8	0.482	0.172	0.005205	1.60E-01	21.718	0.152533	1.58E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
KRT17	8	0.468	0.174	0.007174	1.87E-01	22.769	0.120056	3.75E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
CD44	8	0.463	0.159	0.003532	1.31E-01	28.914	0.02452	3.14E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
DDX11	8	0.460	0.156	0.003309	1.27E-01	23.504	0.100901	2.19E+00	1.000	1.00E+00	1.00E+00
ADAMTS3	8	0.458	0.153	0.00269	1.14E-01	51.134	1.51E-05	4.24E-04	1.000	1.01E-02	1.00E+00
FZD2	8	0.449	0.145	0.001929	9.41E-02	21.433	0.162453	8.02E-01	1.000	1.00E+00	1.00E+00
IRF5	8	0.438	0.148	0.003119	1.23E-01	21.568	0.157705	8.13E+00	0.945	1.00E+00	1.00E+00
PML	8	0.387	0.142	0.006573	1.79E-01	29.830	0.018906	4.21E+00	0.998	1.00E+00	1.00E+00

Los 102 genes se sobreexpresan significativamente en todos los órganos trasplantados y forman una única red reguladora que se activa durante el AR (las redes más relevantes se muestran en la figura 1). Se ha demostrado que dos de los 102 genes (CD44 y CXCL9) pueden servir como biomarcadores no invasivos para el rechazo en suero de un paciente trasplantado, con alta especificidad y sensibilidad. El coeficiente de correlación de Pearson de los genes más significativos de rechazo cruzado de órganos muestra una fuerte correlación entre muchos genes en este grupo. Además se identificaron 12 genes, la mayoría de los cuales están regulados por un factor de transcripción STAT1. Los 12 genes son BASP1, CD6, CD7, CXCL10, CXCL9, INPP5D, ISG20, LCK, NKG7, PSMB9, RUNX3, y TAP1. Estos genes están altamente enriquecidos para dianas farmacéuticas conocidas. Además, se validó la sobreexpresión de estos 12 genes en una cohorte independiente de 118 biopsias de injerto renal usando micromatrices de ADN (n = 101, AR = 43) y RT-PCR (n = 17, AR = 8).

Después, se evaluó el uso de sangre periférica como fuente de diagnóstico y predicción de la etiología específica de la lesión en el injerto. Se desarrolló un análisis de significancia de micromatrices específico de tipo celular (csSAM o análisis de significancia de micromatrices específico de células) para analizar la expresión diferencial de genes para cada tipo de célula en una muestra biológica (sangre periférica) a partir de datos de micromatrices y frecuencias relativas de tipo celular. Se aplicó este método a conjuntos de datos de expresión de genes de sangre completa de receptores de trasplante de riñón. Los presentes resultados mostraron que csSAM identificó centenares de genes expresados diferencialmente en monocitos, que de otro modo no se podían detectar. Además, el perfil de expresión específico de monocitos permitió distinguir con éxito entre grupos AR y STA en receptores de trasplante de órganos. De hecho, el conjunto de genes mínimamente invasivo, para el análisis mediante análisis transcripcional (por ejemplo, QPCR), consiste en una combinación de los genes enumerados en la tabla 2, muchos de los cuales están regulados por pSTAT, según lo determinado por el fosfoflujo. Aunque todos estos genes han sido validados de manera cruzada como biomarcadores altamente específicos (>80%) y sensibles (>80%) para el diagnóstico y la predicción de AR en receptores de trasplante renal pediátricos y adultos, 10 de los 23 genes asimismo son biomarcadores altamente específicos (>80%) y sensibles (>80%) para el diagnóstico y la predicción de AR en receptores adultos de trasplante de corazón.

Tabla 2 Conjunto de genes de sangre periférica para diagnosticar y predecir AR de trasplante de órgano sólido

ID del gen	Valor p	Nº de veces de cambio	AR promedio	STA promedio	AR mediana	STA mediana
DUSP1	0.004	2.2	3.1	1.41	2.11	1.05
NAMPT	0.07	1.68	2.36	1.41	1.71	1.09
PSEN1	0.63	1.07	1.37	1.28	1.29	1.13
MAPK9	0.01	1.49	1.97	1.33	1.73	1.1
NKTR	0.84	1.03	1.19	1.16	1.05	1.17
RYBP	0.1	1.24	1.51	1.21	1.43	1.13
RNF130	0.01	1.56	1.96	1.25	1.85	1.15
IFNGR1	0.01	1.94	6.58	3.38	5.51	2.57
ITGAX	0.01	1.9	2.51	1.32	1.79	1.18
CFLAR	0.002	1.98	5.12	2.58	4.32	1.98
GBP2	0.01	1.49	2	1.34	1.68	1.12
TNFRSF1A	0.08	1.29	2.01	1.56	1.96	1.31
MAP2K3	0.05	1.28	1.54	1.2	1.43	1.15
EPOR	0.003	1.56	1.7	1.08	1.62	0.91
SLC25A37	0.001	1.73	2.47	1.42	2.28	1.13
ANK1	0.06	1.24	1.41	1.13	1.31	1.04
CHST11	0.001	1.8	2.14	1.19	1.79	1.06
LYST	0.08	1.17	1.44	1.23	1.34	1.15
RARA	0.03	1.51	1.85	1.23	1.59	1.16
PCTP	0.0003	1.65	1.97	1.19	1.88	1.09
ABTB1	0.01	1.56	1.9	1.22	1.49	1.01
RXRA	0.05	1.22	1.34	1.09	1.34	1.1
B2M	0.004	1.78	2.36	1.33	1.9	1.1

Para utilizar conjuntos de genes para el diagnóstico no invasivo y la predicción de AR, mientras se controla la infección viral BK (nefropatía por virus BK o BKVN), asimismo se evaluaron los genes urinarios mediante qPCR. Los genes que se analizarán en la orina para el diagnóstico de rechazo se seleccionaron mediante tres estrategias: genes muy estadísticamente significativos (puntuaciones $q < 5\%$ por análisis estadístico de micromatrices, y cambio > 2 veces en el rechazo) de estudios de micromatrices previamente realizados (Affymetrix HU133plus2.0) en 71 muestras de sangre periférica (44AR, 27 estable, STA), 51 muestras de biopsia de trasplante de riñón (32 AR, 19 STA), y genes conocidos presentes en la orina obtenidos del filtrado de datos en Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity). Se seleccionaron dos conjuntos de muestras de orina independientes para la validación de qPCR que consta de 89 muestras de pacientes con AR probado por biopsia ($n = 30$), injertos estables probados por biopsia (STA $n = 40$) e infección por el virus BK (BK $n = 19$, sin AR). El ARN total extraído se sometió entonces a qPCR en placas de 384 pocillos utilizando el sistema RT2 qPCR (SuperArray). Los cebadores se seleccionaron a partir

de secuencias de ADNc de los genes escogidos usando Primer 3.0, un software basado en la web. Se escogieron 26 genes de los datos de la matriz para llevar a cabo qPCR (12 de datos de sangre, 15 de datos de biopsia, algunos de los genes que se sabe que están preestablecidos en la orina). qPCR se llevó a cabo en RT2 qPCR Master Mix (SuperArray). Los niveles relativos de expresión génica de cada gen se calcularon utilizando el método comparativo delta-CT, y se normalizaron a ARN ribosómico 18S. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Se aplicó la prueba T de Student para el análisis estadístico. $P < 0.05$ se consideró significativo. 5 de 19 genes se expresaron significativamente más en AR en comparación con las muestras STA (FCGR3A $p=0.01$; PRRX1 $p=0.02$; PRSS1 $p=0.01$; RNPS1 $p=0.04$ y TLR8 $p=0.01$). Se construyó un modelo de regresión logística utilizando los datos de expresión de qPCR de 5 genes del conjunto de validación 1, lo que dio como resultado una alta especificidad y sensibilidad con una puntuación ROC de 93.8%. El modelo se alimentó con otro conjunto independiente de 34 muestras de orina (conjunto de validación 2: 18AR, 16STA), y se logró una alta puntuación de predicción de AR con una sensibilidad del 80%, especificidad del 89%, valor de predicción positivo (PPV) de 75%, y un valor de predicción negativo (NPV) del 86%. En el conjunto de validación 2 se incluyeron 15 muestras de BK. La expresión de los 5 genes mostrados fue significativamente mayor no solo en muestras de AR en comparación con STA, sino asimismo en AR en comparación con muestras de BK (FCGR3A $p<0.001$, PRRX1 $p=0.001$, PRSS1 $p<0.001$; RNPS1 $p=0.001$ y TLR8 $p<0.03$), confirmando que estos 5 genes son de hecho específicos de AR.

Para el trasplante de médula ósea, se realizaron enfoques similares para armar un estudio para encontrar biomarcadores basados en genes en sangre periférica que puedan diagnosticar y predecir la enfermedad crónica de injerto frente a hospedador. La tabla 3 muestra una lista de 10 genes cuyo nivel de expresión puede usarse para determinar un fenotipo de GvHD en un sujeto que tiene un trasplante alogénico de HCT. Los niveles de expresión génica de estos 10 genes son significativamente más altos en un fenotipo de GvHD con respecto a un fenotipo de no GvHD (por ejemplo, los genes IL1R2, ADAMTS2, AREG, HRASLS, TPST1, IRS2, GPR30, KLF9, ZBTB16 y SESN1 están significativamente exacerbados en GvHD en comparación con un control normal o con receptores de trasplante de no GvHD). En ciertas formas de realización, el nivel de expresión génica del gen IL1R2 puede usarse para determinar un fenotipo de GvHD en un sujeto que tiene un trasplante alogénico de HCT.

Tabla 3. Diez biomarcadores predictivos para GvHD y no GvHD

ID de sonda	ID de Entrez Gené	Símbolo del gen	FDR (%)
A_23_P79398	7850	IL1R2	0
A_23_P321307	9509	ADAMTS2	0
A_23_P259071	374	AREG	2
A_23_P57658	57110	HRASLS	0
A_23_P145965	8460	TPST1	0
A_24_P154037	8660	IRS2	0
A_23_P8640	2852	GPR30	0
A_23_P415401	687	KLF9	0
A_23_P104804	7704	ZBTB16	0
A_23_P93562	27244	SESN1	0

La figura 2A muestra un conjunto de 10 genes derivado de la comparación de muestras de cGvHD activa y cGvHD inactiva seleccionadas aleatoriamente en el conjunto de entrenamiento ($n = 42$; 19 cGvHD inactiva y 23 cGvHD activa) mediante Análisis Estadístico de Micromatrices y Análisis Predictivo de Micromatrices. Las predicciones de cGvHD inactiva se mostraron en color gris, y las predicciones de cGvHD activa se mostraron en color negro, y las predicciones para muestras en el conjunto de ensayo ($n = 21$; 9 cGvHD inactiva y 12 cGvHD activa) fueron 75% de sensibilidad para cGvHD activa, 78% de especificidad para cGvHD inactiva, 82% de PPV, y 70% de NPV. La figura 2B muestra las probabilidades de predicción del conjunto de 10 genes basadas en el modelo de regresión logística multimomial de muestras de cGvHD en el último seguimiento (30 cGvHD inactiva y 33 cGvHD activa en el último seguimiento). El modelo de conjunto de 10 genes se realizó con 85% de sensibilidad, 83% de especificidad, 85% de PPV, y 83% de NPV.

En ciertas formas de realización, los métodos incluyen obtener una muestra de orina del sujeto y determinar el nivel de uno o más péptidos/proteínas en ella para obtener una firma de proteína o péptido de la muestra. La firma de proteína se puede usar entonces para determinar la categoría de trasplante clínica del sujeto, por ejemplo comparando con una o más firmas de proteínas de sujetos que tienen una categoría de trasplante conocida (por ejemplo, rechazo agudo (AR), función de injerto estable (STA), control sano (HC), síndrome nefrótico (NS)). Dichas firmas de proteínas conocidas asimismo pueden denominarse controles o firmas/perfiles de referencia. Asimismo se proporcionan composiciones, sistemas, kits y productos de programas de ordenador que se usan en la práctica de los presentes métodos. En un estudio de análisis de proteoma urinario usando el enfoque de proteómica mediante técnica de análisis masivo ("shotgun"), y explotación de datos de bioinformática, se examinó un total de 92 muestras de orina de 4 categorías clínicas diferentes (AR, STA, NS, control sano), y la validación mediante

ELISA se realizó en las 3 proteínas urinarias más significativas (CD44, UMOD y PEDF) en muestras de orina independientes (Sigdel et al, PROTEMICS Clin. Appl, 2010). Se encontraron un total de 1446 proteínas de orina en orina normal. El umbral de significancia para la identificación positiva de una proteína de orina en un fenotipo fue la presencia de un mínimo de 2 fragmentos de péptidos/proteína en muestras de AR frente a la ausencia de péptidos de esa proteína en muestras de STA y de control sano. El cambio en el número de veces basado en el logaritmo fue significativo, y es >2 en una categoría (AR) frente a la otra categoría (no AR). Las tablas 4A-4C muestran las proteínas urinarias más significativas en AR.

Tabla 4A a 4C: Proteínas específicas del rechazo agudo

Tabla 4A: Proteínas identificadas solo en orina AR

Nº de la muestra	ID de IPI	Símbolo del gen	Nombre de la proteína
1	IPI00103082.7	<i>HLA-DBP</i>	Antígeno de histocompatibilidad HLA clase II, DP(W4) cadena beta
2	IPI00005180.2	<i>IgHM</i>	Antígeno de histocompatibilidad HLA clase II, DRB1-8 cadena beta
3	IPI00021727.1	<i>C4BPA</i>	Cadena alfa de proteína de unión a C4b
4	IPI00641889.1	<i>KIAA1522</i>	Proteína de 25 kDa
5	IPI00746396.1		Proteína de 302 kDa
6	IPI00760688.2	<i>HLA-DR</i>	Antígeno de MHC clase II (fragmento)
7	IPI00027255.1	<i>MYL6B</i>	Cadena ligera de miosina 1, isoforma A del músculo de contracción lenta
8	IPI00783351.1	<i>SUMF2</i>	Isoforma d del factor 2 modificador de sulfatasa
9	IPI00743218.1	<i>HLA-DQB1</i>	Antígeno de histocompatibilidad HLA clase II, DQ(3) cadena beta

Tabla 4B: Proteínas urinarias aumentadas cuantitativamente en AR en comparación con STA

Nº de la muestra	ID de IPI	Símbolo del gen	Nombre de la proteína	Recuentos espectrales de AR	Recuentos espectrales de STA	Cambio, número de veces (LOG2)
1	IPI00017601.1	<i>CP</i>	Ceruloplasmina	439	141	2
2	IPI00032291.1	<i>C5</i>	Complemento C5	26	8	2
3	IPI00410714.4	<i>HBA1</i>	Subunidad alfa de hemoglobina	30	9	2
4	IPI00010858.1	<i>KLK3</i>	Antígeno específico de la próstata	21	4	2
5	IPI00303963.1	<i>C2</i>	Complemento C2	12	4	2
6	IPI00747314.1		Proteína de 13 kDa	15	4	2
7	IPI00477804.2		Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina	10	3	2
8	IPI00464948.3	<i>HLA-DRA</i>	Complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DR alfa	10	1	3
9	IPI00021304.1	<i>KRT2</i>	Queratina, tipo II citoesquelética epidérmica	5	1	2
10	IPI00741163.1	<i>LOC65265</i>	PREDICHA: similar a región V-II de cadena pesada de Ig ARH-77	6	2	2
11	IPI00783393.1		Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina	10	2	2
12	IPI00745363.1	<i>LOC652113</i>	PREDICHA: similar a región V-III de cadena pesada de Ig VH26	6	2	2
13	IPI00386142.1		Región V-II de cadena pesada de Ig ARH-77	12	2	3
14	IPI00737304.1	<i>LOC652141</i>	PREDICHA: similar a región V-III de cadena	6	1	3

ES 2 798 114 T3

Nº de la muestra	ID de IPI	Símbolo del gen	Nombre de la proteína	Recuentos espectrales de AR	Recuentos espectrales de STA	Cambio, número de veces (LOG2)
			pesada de Ig VH26			
15	IPI00556442.1	<i>IGFBP2</i>	Variante de proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a insulina	5	1	2
16	IPI00736985.1	<i>LOC441368</i>	PREDICHA: similar a ceruloplasmina	21	5	2
17	IPI00477540.2		Proteína de 13 kDa	9	3	2
18	IPI00382540.1		Región V-II de cadena pesada de Ig NEWM	11	2	2
19	IPI00386135.1		Región V-VI de cadena lambda de Ig SUT	4	1	2
20	IPI00554676.1	<i>HBE1</i>	Subunidad gamma-2 de hemoglobina	4	1	2
21	IPI00387119.1		Región V-III de cadena kappa de Ig POM	11	3	2
22	IPI00419517.1	<i>IGHV1-69</i>	Proteína IGHV1-69	6	2	2

Tabla 4C: Proteínas urinarias disminuidas cuantitativamente en AR en comparación con STA

Nº de la muestra	ID de IPI	Símbolo del gen	Nombre de la proteína	Recuentos espectrales de AR	Recuentos espectrales de STA	Cambio, número de veces (LOG2)
1	IPI00022426.1	<i>AMBP</i>	Proteína AMBP	724	2201	2
2	IPI00160130.3	<i>CUBN</i>	Cubulina	59	209	2
3	IPI00012503.1	<i>PSAP</i>	Isoforma Sapmu0 de polipéptido proactivador	93	427	2
4	IPI00640271.1	<i>UMOD</i>	Proteína Tamm-Horsefall	122	363	2
5	IPI00745705.1	<i>AMY2A</i>	Amilasa, alfa 2A; variante pancreática	89	264	2
6	IPI00744362.1	<i>FN1</i>	Proteína hipotética DKFZp686K08164	36	126	2
7	IPI00021885.1	<i>FGA</i>	Isoforma 1 de cadena alfa de fibrinógeno	60	176	2
8	IPI00784458.1	<i>FBN1</i>	Proteína de 312 kDa	30	112	2
9	IPI00000073.1	<i>EGF</i>	Factor de crecimiento proepidérmico	37	140	2
10	IPI00328113.2	<i>FBN1</i>	Fibrilina 1	20	76	2
11	IPI00744835.1	<i>PSAP</i>	Isoforma Sapmu9 de polipéptido proactivador	71	312	2
12	IPI00641961.1	<i>COL12A1</i>	Colágeno, tipo XII, alfa 1	39	128	2
13	IPI00783446.1	<i>GAA</i>	Alfaglicosidasa lisosomal	29	120	2
14	IPI00329573.8	<i>COL12A1</i>	Isoforma larga de la cadena alfa1(XII) de colágeno	32	117	2
15	IPI00023673.1	<i>LGALS3BP</i>	Proteína de unión a galectina 3	46	134	2
16	IPI00385896.1	<i>SPP1</i>	Isoforma D de osteopontina	27	109	2
17	IPI00293088.4	<i>GAA</i>	Proteína de 106 kDa	28	114	2
18	IPI00008787.3	<i>NAGLU</i>	AlfaNacetilglucosaminidasa	27	96	2
19	IPI00741768.1	<i>LOC64213</i>	PREDICHA: similar a Maltasa-glucoamilasa, intestinal	25	114	2
20	IPI00003919.1	<i>QPCT</i>	Glutaminil péptido ciclotransferasa	30	87	2
21	IPI00783792.1	<i>MGAM</i>	Proteína de 192 kDa	10	43	2
22	IPI00220143.2	<i>MGAM</i>	Maltasa-glucoamilasa, intestinal	22	97	2

Nº de la muestra	ID de IPI	Símbolo del gen	Nombre de la proteína	Recuentos espectrales de AR	Recuentos espectrales de STA	Cambio, número de veces (LOG2)
23	IPI00240345.3	CLEC14A	Miembro A de la familia 14 del dominio de lectina tipo C	5	29	3

Se realizó un análisis peptidómico no invasivo mediante espectrometría de masas, seguido de la verificación mediante MRM, y se analizaron 70 muestras de orina de pacientes de trasplante renal único (n = 50) y controles (n = 20). Se identificó un panel específico de 53 péptidos para rechazo agudo (AR). La secuenciación de péptidos reveló mecanismos subyacentes de lesión del injerto con un papel fundamental para la degradación proteolítica de la uromodulina (UMOD) y una serie de colágenos (Tabla 5A). El análisis integrador de las señales transcripcionales de las biopsias de trasplante renal emparejadas, junto con las muestras de orina, revela cambios transcripcionales coordinados para los genes correspondientes, además de la desregulación de las proteínas de la matriz extracelular en AR (MMP7, SERPING1 y TIMP1). Q-PCR en un conjunto independiente de 34 biopsias de trasplante, con y sin AR, valida los cambios coordinados en la expresión para los genes correspondientes en el tejido de rechazo, con un panel de 6 biomarcadores génicos (COL1A2, COL3A1, UMOD, MMP7, SERPING1, TIMP1) que asimismo puede clasificar AR con alta especificidad y sensibilidad (ROC, AUC 0.98) (Tabla 5b).

Tabla 5A

Precursor de proteína	Masa del péptido (Da)	Sec. del péptido
Colágenoalfa alfa-1(XVIII)	1142.53	GPPGPPGPPGPPS
Colágenoalfa 3(IV)	1161.51	GEPGPPGPPGNLG
Colágenoalfa-4(IV)	1219.55	GLPGPPGPKGPRG
Colágenoalfa-4(IV)	1220.55	GLPGPPGPKGPRG
Colágenoalfa-4(IV)	1221.56	GLPGPPGPKGPRG
Colágenoalfa-1(1)	1251.55	APGDRGEPGPPGP
Colágenoalfa-1(1)	1251.55	APGDRGEPGPPGP
Colágenoalfa-1(1)	1409.65	GPPGPPGPPGPPGPPS
Colágenoalfa-1(VII)	1692.81	PGLPGQVGETGKPGAPGR
Colágenoalfa-5(IV)	1733.77	GIKGEKGNPGQPGLPLP
Colágenoalfa-1(1)	2064.92	NGDDGEAGKPRPGERGPPGP
Colágenoalfa-1(1)	2066.92	NGDDGEAGKPRPGERGPPGP
Colágenoalfa-2 (I)	2081.93	DGPPGRDQPGHKGGERGYPG
Colágenoalfa-1(1)	3014.44	ESGREGAPGAEGSPGRDGSFGAKGDRGETGPA
Uromodulina	1681.98	VIDQSRVNLNLPITR
Uromodulina	1912.07	SGSVIDQSRVNLNLPITR

Tabla 5B

Símbolo del gen	AR	STA	Valor p	Cambio, nº de veces	Aumento/Disminución
COL1A2	8.55	2.27	0.03	3.8	Aumento
COL3A1	13.53	2.93	0.02	4.6	Aumento
MMP7	10.85	0.79	0.01	13.8	Aumento
SERPING1	6.48	0.91	0.00	7.1	Aumento
TIMP1	15.80	1.27	0.01	12.5	Aumento
UMOD	0.46	1.17	0.08	2.5	Disminución

El enfoque único de los análisis transcripcionales integrados de biopsia y peptidomía en orina revela que las vías clave de remodelación de colágeno están moduladas en el tejido de AR, y pueden ser el desencadenante de la fibrosis crónica de injerto aguas abajo después de un episodio de AR. Los productos de degradación proteolítica de las proteínas correspondientes en la orina proporcionan una herramienta única no invasiva para el diagnóstico de AR.

Los aspectos de la presente descripción incluyen métodos para determinar la categoría de trasplante clínica de un sujeto que ha recibido un trasplante de riñón. Las categorías de trasplante clínicas incluyen, pero no se limitan a: respuesta de rechazo agudo (AR), aloinjerto estable (STA), síndrome nefrótico (NS), y similares.

En la lista anterior se encuentran los biomarcadores de genes y proteínas para la lesión de trasplante. Asimismo se han aplicado algoritmos informáticos personalizados para identificar biomarcadores basados en anticuerpos para cualquier tipo de lesión renal, en este caso incluso centrándose en el riñón nativo.

Se utilizaron matrices de proteínas de alta densidad para analizar 60 muestras de suero recogidas de 20 pacientes renales a los 0, 6 y 24 meses posteriores al trasplante con biopsias de protocolo. Se utilizaron matrices de proteínas con alrededor de 8300 antígenos, y los datos se analizaron para identificar anticuerpos específicos de CAI y su correlación con la progresión de la lesión crónica. Un repertorio de 111 anticuerpos nHLA aumentó significativamente en respuesta a la lesión crónica de aloinjerto, de los cuales 31 anticuerpos siguen la lesión de aloinjerto. Se encontró que el nivel de anticuerpos de un conjunto de 5 anticuerpos (CXCL9/MIG, CXCL11/ITAC, IFN-Gamma, CCL21/6CKINE, y GDNF) en el momento del implante está correlacionado con la progresión de la lesión.

10 Tabla 6 Abs específicos para CAI correlacionan con la puntuación CADI y puntuaciones IFTA:

Nº de la muestra	Símbolo del gen	CADI, r, p	IF-TA r, p
1	IFNG	0.68, < 0.0001	0.61, < 0.0001
2	CXCL9/MIG	0.61, < 0.0001	0.55, 0.0002
3	CXCL11/ITAC	0.51, 0.0009	0.42, 0.0072
4	CSNK2A2	0.51, 0.0008	0.52, 0.0006
5	GDNF	0.63, < 0.0001	0.58, < 0.0001
6	BHMT2	0.47, 0.002	0.54, 0.0003
7	6CKINE	0.56, 0.0002	0.54, 0.0003
8	CSNK2A1	0.50, 0.0011	0.54, 0.0004
9	J0-1(HARS)	0.63, < 0.0001	0.63, < 0.0001
10	CSNK1G1	0.49, 0.0012	0.51, 0.0008
11	IL21	0.57, 0.0001	0.51, 0.0008
12	CSNK1G3	0.35, 0.0263	0.43, 0.006
13	IL-8	0.43, 0.006	0.48, 0.002
14	PRKCE	0.41, 0.009	0.48, 0.002
15	FLJ21908	0.48, 0.002	0.47, 0.002
16	WIBG	0.39, 0.01	0.46, 0.003
17	ATXN3	0.46, 0.003	0.45, 0.003
18	RNAPOL	0.39, 0.01	0.45, 0.004
19	MAPRE2	0.34, 0.03	0.45, 0.004
20	CCL19	0.40, 0.009	0.43, 0.006

Se realizó un ensayo ELISA para validar los hallazgos basados en matrices de proteínas. Para la validación mediante el ensayo ELISA, se seleccionó un conjunto de anticuerpos basado en su significancia estadística y relevancia biológica. Se realizó la medida mediante ELISA de anticuerpos y se demostró su validez en la separación de los grupos CAI de los NCAI, así como la capacidad predictiva de dos de los niveles de anticuerpos a los 6 meses para la progresión de la lesión a los 24 meses. Los ensayos de Elisa se desarrollaron y se optimizaron para validar el descubrimiento realizado por la plataforma de matriz de proteínas. Se realizaron ensayos de ELISA en 4 antígenos (MIG/CXCL9, ITAC/CXCL11, CSNK2A2, y PDGFRA) para validar la observación realizada por la plataforma de matriz de proteínas. Se incluyó el suero recogido de pacientes con trasplante renal con nCAI demostrada por biopsia (n = 30), y el suero recogido de pacientes con trasplante renal con CAI demostrada por biopsia (n = 31). Se observó un aumento significativo de CXCL9/MIG (p<0.02), CXCL11/ITAC (p<0.014), CSNK2A2 (p<0.0002), y PDGFRA (p<0.0001) para el grupo de CAI en comparación con nCAI.

En ciertas formas de realización, el método incluye: (a) evaluar la cantidad de uno o más péptidos/proteínas en una muestra de orina de un sujeto trasplantado para obtener una firma de proteína; y (b) determinar la categoría de trasplante del sujeto basándose en la firma de la proteína. En ciertas formas de realización, la firma de proteína comprende datos de nivel de proteína para una o más proteínas en cualquiera de las tablas 4A a 4C y 5A.

Como se resume anteriormente, los aspectos de la presente descripción proporcionan métodos para determinar una categoría de trasplante clínica de un sujeto que ha recibido un trasplante de riñón, así como reactivos, sistemas, kits y productos de programas de ordenador para uso en la práctica de los presentes métodos. Primero se describen los presentes métodos, seguido de una revisión de los reactivos, sistemas, kits y productos de programas de ordenador para uso en la práctica de los presentes métodos.

Métodos para determinar una categoría de trasplante clínica

Los aspectos de la presente descripción incluyen métodos para determinar una categoría de trasplante clínica de un sujeto que ha recibido un trasplante de riñón.

Como es conocido en el campo del trasplante, un órgano, tejido o célula del injerto puede ser alogénico o xenogénico, de modo que los injertos pueden ser aloinjertos (órgano sólido y médula ósea) o xenoinjertos.

- 5 En ciertas formas de realización, el método puede considerarse un método de monitorización de un sujeto para determinar una categoría de trasplante clínica, por ejemplo en uno o más puntos de tiempo después del trasplante de riñón. Las categorías de trasplante clínicas que pueden determinarse utilizando los métodos de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a: rechazo agudo de aloinjerto (AR) y aloinjerto estable (STA). En ciertas formas de realización, los presentes métodos distinguen una o más de las categorías de trasplante clínicas de las categorías sin trasplante, que incluyen sujetos con proteinuria no específica con enfermedades renales nativas (síndrome nefrótico o NS), sujetos con función renal sana (HC), sujetos con enfermedad de injerto contra hospedador crónica o aguda (GVHD), etc.
- 10 Al practicar los métodos en cuestión, la muestra de orina se analiza para obtener una firma de proteína de la muestra, o perfil de proteína, en el que se determina la cantidad de uno o más péptidos/proteínas específicos en la muestra, en la que la cantidad determinada puede ser de naturaleza relativa y/o cuantitativa. En ciertas formas de realización, la firma de la proteína incluye medidas para la cantidad de una o más proteínas (o péptidos derivados de ellas) mostradas en las tablas 4A a 4C y 5A.
- 15 Como se detalla en la sección de Ejemplos a continuación, la expresión génica de tejido, sangre u orina, o el análisis de proteínas en orina, identificaron diferentes firmas de genes y/o proteínas con poder predictivo para las categorías de trasplante clínicas. La expresión perfil de gen se usa para denotar la determinación de la expresión, a nivel de ARNm, de uno o más genes en una muestra; el perfil de proteínas se usa ampliamente para incluir un perfil de una o más proteínas/péptidos diferentes en la muestra, en el que las proteínas derivan de los productos de expresión de uno o más genes. Como tal, en ciertas formas de realización, se evalúa el nivel de expresión de solo un gen y/o proteína que se muestra en cualquiera de las tablas. En aún otras formas de realización, se evalúa el nivel de expresión de dos o más genes y/o proteínas de cualquiera de las tablas, por ejemplo 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 100 o más, etc. Se observa que el nivel de expresión de uno o más genes y/o proteínas adicionales distintos de los presentados en las tablas asimismo se puede evaluar en la firma del gen y/o proteína.
- 20 La firma del gen/proteína/péptido de una muestra se puede obtener utilizando cualquier método conveniente para el análisis de expresión génica/proteína/péptido. Como tal, no se pretende ninguna limitación a este respecto. El análisis de péptidos a título de ejemplo incluye, pero no se limita a: HPLC, espectrometría de masas, perfil de péptidos basado en LC-MS (por ejemplo, LC-MALDI), monitorización de reacción múltiple (MRM), ELISA, micromatrices, QPCR, y similares. En el sentido más amplio, la evaluación de la expresión de genes y/o proteínas puede ser cualitativa o cuantitativa. Como tal, cuando la detección es cualitativa, los métodos proporcionan una lectura o evaluación, por ejemplo confirmación, de si el analito diana (por ejemplo, gen o proteína) está presente o no en la muestra que se está analizando. En aún otras formas de realización, los métodos proporcionan una detección cuantitativa de si el analito diana está presente en la muestra que se está analizando, es decir, una evaluación o confirmación de la cantidad real o la abundancia relativa del analito diana, por ejemplo gen y/o proteína en la muestra que se analiza. En tales formas de realización, la detección cuantitativa puede ser absoluta o, si el método es un método para detectar dos o más analitos diferentes en una muestra, relativa. Como tal, el término “cuantificar”, cuando se usa en el contexto de cuantificar un analito diana en una muestra, puede referirse a una cuantificación absoluta o relativa. La cuantificación absoluta se puede lograr mediante la inclusión de concentración o concentraciones conocidas de uno o más analitos de control y referenciándolas al nivel detectado del analito o analitos diana con los analitos de control conocidos (por ejemplo, mediante la generación de una curva estándar). Alternativamente, la cuantificación relativa se puede lograr mediante la comparación de los niveles o cantidades detectados entre dos o más analitos diana diferentes para proporcionar una cuantificación relativa de cada uno de los dos o más analitos diferentes, por ejemplo entre sí. Además, se puede determinar una cuantificación relativa utilizando un valor (o perfil) de control, o referencia, de una o más muestras de control. Los perfiles de control/referencia se describen con más detalle a continuación.
- 30 En ciertas formas de realización, se pueden analizar analitos adicionales más allá de los enumerados anteriormente, en las que los analitos adicionales pueden ser proteínas adicionales, ácidos nucleicos adicionales, u otros analitos. Por ejemplo, los genes cuyo nivel/patrón de expresión se modula bajo diferentes condiciones de trasplante (por ejemplo, durante una respuesta de AR) pueden evaluarse (por ejemplo, de una muestra de biopsia, muestra de sangre, muestra de orina, etc., del sujeto). En ciertas formas de realización, se pueden usar analitos adicionales para evaluar características adicionales de trasplante, que incluyen, pero no se limitan a: un fenotipo tolerante al injerto en un sujeto, lesión crónica de aloinjerto (rechazo crónico); toxicidad por fármacos inmunosupresores, GVHD, o efectos secundarios adversos, incluida la hipertensión inducida por fármacos; genes asociados con la edad o el índice de masa corporal que se correlacionan con la patología renal o explican las diferencias en la aceptación del injerto relacionado con la edad del receptor; marcadores de tolerancia inmunitaria; genes encontrados en encuestas bibliográficas con funciones inmunomoduladoras que pueden desempeñar un papel en los resultados del trasplante. Además, se pueden evaluar otros genes relacionados con la función, por ejemplo para evaluar la calidad de la muestra (sesgo de 3' a 5' en la ubicación de la sonda), error de muestreo en estudios basados en biopsias, marcadores de la superficie celular, y normalización de proteínas/genes para calibrar los resultados.
- 35 Al practicar los métodos de la presente descripción, se puede emplear cualquier protocolo conveniente de evaluación/cuantificación de genes y/o proteínas, en el que los niveles de uno o más genes/proteínas en la muestra

analizada se determinan para generar una firma de gen y/o proteína para la muestra. Los métodos representativos incluyen, pero no se limitan a: análisis mediante MRM, inmunoensayos estándar (por ejemplo, ensayos ELISA, transferencias Western, análisis de proteínas basadas en FACS, etc.), ensayos de actividad de proteínas, incluyendo ensayos de actividad de proteínas multiplex, QPCR, matrices de expresión, etc. Después de obtener la firma del gen y/o proteína de un sujeto, la firma del gen/proteína se analiza/evalúa para determinar una categoría de trasplante del sujeto (por ejemplo, si el sujeto está experimentando una respuesta de AR). En ciertas formas de realización, el análisis incluye comparar la firma de proteína con una firma de referencia o control, por ejemplo una firma de gen/proteína de referencia o control, para determinar la categoría de trasplante del sujeto trasplantado. Los términos “referencia” y “control”, como se usan en la presente memoria, significan un nivel (o patrón) del analito estandarizado que puede usarse para interpretar el patrón del analito de una muestra de un sujeto. Por ejemplo, un perfil de referencia puede incluir datos de nivel de gen/proteína para uno o más genes/proteínas de interés que se evalúan en la muestra del sujeto/paciente. El perfil de referencia o control puede ser un perfil que se obtiene de un sujeto (un sujeto de control) que tiene un fenotipo AR y, por lo tanto, puede ser una firma de referencia o control positiva para AR. Además, el perfil de referencia/control puede ser de un sujeto de control que se sabe que no está experimentando AR (por ejemplo, STA, NS o HC) y, por lo tanto, puede ser una firma de referencia/control negativa.

En ciertas formas de realización, la firma de gen/proteína obtenida se compara con un único perfil de referencia/control para determinar la categoría de trasplante del sujeto. En aún otras formas de realización, la firma de gen/proteína obtenida se compara con dos o más perfiles de referencia/control diferentes para obtener información adicional o más detallada sobre la categoría de trasplante del sujeto. Por ejemplo, la firma de gen/proteína obtenida se puede comparar con un perfil de referencia positivo y negativo para obtener información confirmada sobre si el sujeto está experimentando una respuesta de AR.

La comparación de la firma de gen/proteína obtenida y el uno o más perfiles de referencia/control puede realizarse usando cualquier metodología conveniente, en la que los expertos en la materia de matrices conocen una variedad de metodologías, por ejemplo comparando imágenes digitales de firmas de genes/proteínas al comparar bases de datos de firmas de péptidos y/o perfiles de expresión de genes, etc. Las patentes que describen formas de comparar perfiles de expresión incluyen, pero no se limitan a, las patentes US nº 6.308.170 y nº 6.228.575.

La etapa de comparación da como resultado información con respecto a cuán similar o diferente es la firma del gen/proteína obtenida con el/los perfiles de control/referencia, información de similitud/desigualdad la cual se emplea para determinar la categoría de trasplante del sujeto. Por ejemplo, la similitud de la firma de gen/proteína obtenida con la firma de gen/proteína de una muestra de control de un sujeto que experimenta una respuesta de AR activa indica que el sujeto está experimentando AR. Del mismo modo, la similitud de la firma de gen/proteína obtenida con la firma de proteína de una muestra de control de un sujeto que no ha tenido (o no tiene) un episodio de AR (por ejemplo, STA) indica que el sujeto no está experimentando AR.

Dependiendo del tipo y la naturaleza del o de los perfiles de referencia/control con los que se compara la firma de gen/proteína obtenida, la etapa de comparación anterior produce una variedad de diferentes tipos de información sobre el sujeto así como la muestra empleada para el ensayo. Como tal, la etapa de comparación anterior puede producir una determinación positiva/negativa de una respuesta de AR continua. En ciertas formas de realización, la determinación/predicción de AR se puede acoplar con una determinación de características adicionales del injerto y la función del mismo. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, se pueden analizar otras patologías relacionadas con el injerto, por ejemplo rechazo crónico (o CAN) y/o toxicidad del fármaco (DT), enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD), BKVN (ver, por ejemplo, la solicitud de patente US nº 11/375,681, presentada el 3 de marzo de 2006).

En ciertas formas de realización, un perfil de referencia es un perfil de referencia compuesto, que tiene datos de control derivados de más de un sujeto y/o muestra. Por ejemplo, un perfil de referencia puede incluir datos de nivel de proteína promedio de muestras de orina de sujetos que tienen las mismas categorías de trasplante o similares.

Los presentes métodos además encuentran uso en aplicaciones farmacogenómicas. En estas aplicaciones, un sujeto/hospedador/paciente es monitorizado primero para determinar su categoría de trasplante clínica (por ejemplo, para una respuesta de AR) de acuerdo con el sujeto descrito, y después se trata usando un protocolo determinado, por lo menos en parte, sobre los resultados de la monitorización. Por ejemplo, se puede evaluar la presencia o ausencia de AR en un hospedador utilizando un protocolo tal como el protocolo de diagnóstico descrito anteriormente. El sujeto puede ser tratado entonces utilizando un protocolo cuya idoneidad se determina utilizando los resultados de la etapa de monitorización. Por ejemplo, cuando el sujeto se clasifica como que tiene una respuesta de AR, la terapia inmunosupresora se puede modular, por ejemplo aumentar o cambiar los medicamentos, como se conoce en la técnica para el tratamiento/prevencción de AR. Del mismo modo, cuando el sujeto se clasifica como libre de AR, la terapia inmunosupresora se puede reducir, por ejemplo para reducir el potencial de DT.

Al practicar los presentes métodos, un sujeto generalmente es monitorizado para detectar AR después de recibir un injerto o trasplante. El sujeto puede examinarse una vez o en serie después de recibir el trasplante, por ejemplo semanalmente, mensualmente, bimestralmente, semestralmente, anualmente, etc. En ciertas formas de

realización, el sujeto se monitoriza antes de que ocurra un episodio de AR. En ciertas otras formas de realización, el sujeto se monitoriza después de la aparición de un episodio de AR.

Los presentes métodos pueden emplearse con una variedad de diferentes tipos de sujetos trasplantados. En muchas formas de realización, los sujetos pertenecen a la clase de mamíferos, incluidos los órdenes carnívoro (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, ratones, cobayas y ratas), lagomorfa (por ejemplo, conejos), y primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés, y monos). En ciertas formas de realización, los animales u hospedadores, es decir, los sujetos (asimismo referidos en la presente memoria como pacientes) son seres humanos.

Los aspectos de la presente descripción incluyen métodos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto de riñón u otro órgano sólido está experimentando una respuesta de rechazo agudo (AR) al evaluar el nivel de uno o más genes y/o proteínas en una muestra de sangre y/u orina del sujeto para obtener una firma de gen/proteína, y determinar si el sujeto está experimentando una respuesta de AR en base a la firma de gen/proteína. En ciertas formas de realización, el uno o más genes/proteínas incluyen por lo menos un gen/proteína seleccionado de las tablas. Además, la presente descripción asimismo proporciona un método para determinar si un sujeto que ha recibido un trasplante de médula ósea está sufriendo enfermedad crónica de injerto frente a hospedador (GVHD). Como tal, la firma de gen/proteína puede contener una fecha de expresión de nivel de gen/proteína para un gen/proteína, 2 o más genes/proteínas, 3 o más genes/proteínas, 5 o más genes/proteínas, 10 o más genes/proteínas, 20 o más genes/proteínas, etc., que se enumeran en cualquiera de las tablas. La selección de qué gen o genes, proteína o proteínas de las tablas se incluirán en la firma de gen/proteína estará determinada por los deseos del usuario. De este modo, la firma de gen/proteína puede contener datos de expresión de nivel de proteína para por lo menos un gen/proteína de una única tabla, de dos tablas, tres tablas, o de todas las tablas. No se pretende ninguna limitación a este respecto.

En ciertas formas de realización, el uno o más genes/proteínas en la firma del gen y/o proteína incluye la proteína CD44, UMOD y PEDF en la orina. En tales formas de realización, se determina que el sujeto está experimentando una respuesta de AR cuando se reducen los niveles individuales y/o combinados de la proteína CD44, UMOD y PEDF en la muestra de orina en comparación con una firma de proteína de referencia de control de no AR. En ciertas formas de realización, la una o más proteínas incluyen una proteína seleccionada de una tabla, en las que se determina que el sujeto está experimentando una respuesta de AR cuando la proteína seleccionada de una tabla se detecta en la firma de gen/proteína. Se puede evaluar cualquier número de genes/proteínas presentados en las tablas, incluyendo 1 o más, 3 o más, 5 o más, e incluyendo todos los genes/proteínas presentados en las tablas. Se puede evaluar cualquier número de genes/proteínas enumerados en las tablas, incluyendo 1 o más, 3 o más, 5 o más, e incluyendo todos los genes/proteínas enumerados en las tablas. Se determina que el sujeto está experimentando una respuesta de AR o respuesta de BKVN o respuesta de CAI, cuando el nivel de la proteína y/o genes seleccionados de cualquiera de las tablas aumenta o disminuye estadísticamente en la firma de gen/proteína en comparación con una firma de proteína y/o gen de referencia de control de no lesión o una estable (STA).

Combinaciones

Se aprecia que ciertas características que, por claridad, se describen en el contexto de formas de realización separadas, asimismo se pueden proporcionar en combinación en una sola forma de realización. Por el contrario, varias características que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola forma de realización, asimismo se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las formas de realización pertenecientes a proteínas que se usan como marcadores para monitorizar un trasplante renal (por ejemplo, determinar el estado de un injerto renal, por ejemplo AR, NS, STA, etc.) o cualquier otro trasplante de órgano sólido o médula ósea están comprendidas específicamente en la presente descripción, y se describen en la presente memoria como si todas y cada una de las combinaciones se describieran individual y explícitamente. Como tal, cualquier combinación de genes/proteínas de una o más de cualquiera de las tablas descritas en la presente memoria se describe en la presente memoria como si todas y cada una de las subcombinaciones de proteínas se describieran individual y explícitamente en la presente memoria.

Bases de datos de perfiles de expresión de genes determinantes de fenotipo

Asimismo se proporcionan bases de datos de firmas de expresión génica/proteína de diferentes categorías de trasplante, por ejemplo AR, STA, NS, y similares. Las firmas de expresión génica/proteína y sus bases de datos pueden proporcionarse en una variedad de medios para facilitar su uso (por ejemplo, en un formato accesible/legible por el usuario). "Medios" se refiere a una fabricación que contiene la información del perfil de expresión. Las bases de datos de la presente descripción se pueden grabar en medios legibles por ordenador, por ejemplo cualquier medio que pueda ser leído y accedido directamente por un usuario que utilice un ordenador. Dichos medios incluyen, pero no se limitan a: medios de almacenamiento magnéticos, tales como disquetes, medios de almacenamiento de discos duros y cintas magnéticas; medios de almacenamiento ópticos tales como CD-ROM; medios de almacenamiento eléctricos tales como RAM y ROM; e híbridos de estas categorías, tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos. Un experto en la materia puede apreciar fácilmente cómo se puede usar cualquiera de los medios legibles por ordenador actualmente conocidos para crear una fabricación

que comprende un registro de la presente información de la base de datos. "Grabado" se refiere a un proceso para almacenar información en un medio legible por ordenador, utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Se puede escoger cualquier estructura conveniente de almacenamiento de datos, en función de los medios utilizados para acceder a la información almacenada. Se puede usar una variedad de programas y formatos de procesador de datos para el almacenamiento, por ejemplo archivo de texto de procesamiento de texto, formato de base de datos, etc. De este modo, un usuario puede acceder a las bases de datos del perfil de expresión del sujeto, es decir, los archivos de la base de datos se guardan en un formato legible por el usuario (por ejemplo, un formato legible por ordenador, en el que un usuario controla el ordenador).

Como se usa en la presente memoria, "un sistema informático" se refiere a los medios de hardware, medios de software, y medios de almacenamiento de datos utilizados para analizar la información de la presente descripción. El hardware mínimo de los sistemas basados en ordenador de la presente descripción comprende una unidad central de procesamiento (CPU), medios de entrada, medios de salida, y medios de almacenamiento de datos. Un experto en la materia puede apreciar fácilmente que cualquiera de los sistemas basados en ordenador actualmente disponibles es adecuado para la utilización en la presente descripción.

Los medios de almacenamiento de datos pueden comprender cualquier fabricación que comprenda un registro de la presente información como se describe anteriormente, o un medio de acceso a memoria que puede acceder a dicha fabricación.

Se puede usar una variedad de formatos estructurales para los medios de entrada y salida para ingresar y emitir la información en los sistemas basados en ordenador de la presente invención, por ejemplo hacia y desde un usuario. Un formato para un medio de salida clasifica los perfiles de expresión (por ejemplo, una firma de expresión génica/proteína) que posee diversos grados de similitud con un perfil de expresión de referencia (por ejemplo, una firma de referencia de expresión génica/proteína). Dicha presentación proporciona a un experto (o usuario) una clasificación de similitudes, e identifica el grado de similitud contenido en el perfil de expresión de ensayo con uno o más perfiles de referencia.

Como tal, el sujeto descrito incluye además un producto de programa informático para determinar una categoría de trasplante clínica de un sujeto que ha recibido un aloinjerto de riñón. El producto de programa informático, cuando se carga en un ordenador, está configurado para emplear una firma de expresión génica/proteína de una muestra de orina de un sujeto para determinar una categoría de trasplante clínica para el sujeto. Una vez determinada, la categoría de trasplante clínica se proporciona a un usuario en un formato legible por el usuario. En ciertas formas de realización, la firma de expresión génica/proteína incluye datos para el nivel de expresión génica/proteína de uno o más péptidos presentados en las tablas 3 a 10 (o cualquier combinación de los mismos como se describe en la presente memoria). Además, el producto del programa informático puede incluir una o más firmas de expresión génica/proteína de referencia o control (como se describe en detalle anteriormente) que se emplean para determinar la categoría de trasplante clínica del paciente.

De este modo, los aspectos de la presente descripción incluyen productos de programas informáticos para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto de riñón está experimentando una respuesta de AR. El producto del programa informático, cuando se carga en un ordenador, está configurado para emplear una firma de expresión génica/proteína de una muestra de orina del sujeto para determinar si el sujeto está experimentando una respuesta de AR, y proporcionar la respuesta de AR determinada a un usuario en un formato legible por el usuario, en el que la firma de expresión génica/proteína comprende datos para el nivel de proteína y/o gen de una o más de las proteínas/genes enumerados en cualquiera de las tablas.

Reactivos, sistemas y kits

Asimismo se proporcionan reactivos, sistemas y kits de los mismos para practicar uno o más de los métodos descritos anteriormente. Los presentes reactivos, sistemas y kits de los mismos pueden variar mucho. Los reactivos de interés incluyen reactivos diseñados específicamente para uso en la producción de las firmas de expresión génica/proteína descritas anteriormente. Estos incluyen un elemento de evaluación de expresión génica/nivel de proteína compuesto por uno o más reactivos. El término sistema se refiere a una colección de reactivos, sin embargo compilados, por ejemplo adquiriendo la colección de reactivos de las mismas o diferentes fuentes. El término kit se refiere a una colección de reactivos proporcionados, por ejemplo vendidos, juntos.

Los presentes sistemas y kits incluyen reactivos para la determinación del nivel de expresión de péptidos/proteínas o genes (por ejemplo, ARNm), por ejemplo los que encuentran uso en ensayos ELISA, ensayos de transferencia Western, ensayos de MS (por ejemplo, LC-MS), ensayos de HPLC, ensayos de citometría de flujo, ensayos a base de matrices, PCR, ensayos de hibridación, transferencias Northern, y similares. Un tipo de dicho reactivo es una o más sondas específicas para una o más proteínas enumeradas en cualquiera de las tablas en la presente memoria descritas.

Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos (como son bien conocidos en la técnica) encuentran uso en los presentes sistemas como sondas para péptidos/proteínas. En ciertas formas de realización,

- las matrices de anticuerpos que contienen anticuerpos en ubicaciones conocidas en un sustrato se proporcionan en los presentes sistemas (ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.591.570; nº 5.143.854; nº 7.354.721). Se pueden emplear sondas para cualquier combinación de genes enumerados en las tablas en la presente memoria descritas. Las presentes matrices pueden incluir sondas solo para aquellas proteínas que se enumeran en las tablas descritas en la presente memoria, o pueden incluir proteínas adicionales que no se enumeran en ellas, tales como sondas para proteínas cuyo patrón de expresión se puede usar para evaluar características de trasplante adicionales, así como otras proteínas relacionadas con la función del ensayo de matriz, por ejemplo para evaluar la calidad de la muestra, el error de muestreo, y la normalización de los niveles de proteína para calibrar los resultados, y similares.
- Como otro ejemplo, la expresión génica puede evaluarse usando un reactivo que incluye sondas específicas del gen. Un tipo de dicho reactivo es una matriz de ácidos nucleicos de sonda en los que se representan los genes determinantes de fenotipo de interés. Se conoce en la técnica una variedad de formatos de matriz diferentes, con una amplia variedad de estructuras de sonda, composiciones de sustrato y tecnologías de fijación diferentes. En muchas formas de realización, las matrices incluyen sondas para 1 o más de los genes enumerados en las tablas descritas en la presente memoria. Las presentes matrices pueden incluir solo aquellos genes que se presentan en las tablas, o pueden incluir genes adicionales que no se presentan (por ejemplo, como controles o para la determinación de otros fenotipos del sujeto o condición de la muestra). Otro tipo de reactivo que está diseñado específicamente para generar perfiles de expresión de genes determinantes de fenotipo es una colección de cebadores específicos de genes que está diseñada para amplificar selectivamente dichos genes.
- Los sistemas y kits pueden incluir las matrices descritas anteriormente y/o sondas específicas o colecciones de sondas. Los sistemas y kits pueden incluir además uno o más reactivos adicionales empleados en los diversos métodos, tales como diversos medios amortiguadores, por ejemplo amortiguadores de hibridación y lavado, conjuntos de sondas prefabricadas, reactivos y componentes de purificación de sondas marcados, tales como columnas giratorias, etc., reactivos de generación y detección de señales, por ejemplo anticuerpos secundarios (por ejemplo, conjugados con restos detectables, por ejemplo peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, etc.), sustratos quimiofluorescentes o quimioluminiscentes, restos fluorescentes, y similares.
- Los presentes sistemas y kits asimismo pueden incluir un elemento de determinación de fenotipo, elemento el cual es, en muchas formas de realización, una firma de péptido de referencia o control o un perfil de expresión génica que puede emplearse, por ejemplo, por un medio informático adecuado, para determinar una categoría de trasplante basada en una firma de proteína de "entrada". Los elementos de determinación de fenotipo representativos incluyen bases de datos de firmas de proteínas, por ejemplo perfiles de referencia o control, como se describió anteriormente.
- Además de los componentes anteriores, presentes los sistemas/kits incluirán además instrucciones para practicar los presentes métodos. Estas instrucciones pueden estar presentes en los presentes 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 adecuado, por ejemplo un trozo o trozos de papel en los que se imprime la información, en el envase del kit, en un prospecto, etc. Todavía otro medio sería un medio legible por ordenador, por ejemplo disquete, CD, etc., en el que se haya grabado la información. Todavía otro medio que puede estar presente es una dirección de sitio web que se puede utilizar a través de Internet para acceder a la información en un sitio eliminado. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.
- De este modo, los aspectos de la presente descripción proporcionan sistemas para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto de riñón está experimentando una respuesta de rechazo agudo (AR). El sistema incluye: un elemento de evaluación de nivel de proteína configurado para evaluar el nivel de una o más proteínas en una muestra de orina de un sujeto que ha recibido un aloinjerto de riñón para obtener una firma de proteína, en el que la una o más proteínas incluyen una proteína seleccionada de: tabla 4A a 4C y/o 5A; y un elemento de determinación de fenotipo configurado para emplear la firma de proteína para determinar si el sujeto está experimentando una respuesta de AR.
- En ciertas formas de realización, la una o más proteínas en la firma de proteína incluyen la proteína CD44. En ciertas formas de realización, la una o más proteínas incluyen además UMOD y PEDF.
- En ciertas formas de realización, la una o más proteínas incluyen una proteína seleccionada de la tabla 4A. Se puede evaluar cualquier número de proteínas enumeradas en la tabla 4A, incluyendo 1 o más, 3 o más, 5 o más, e incluyendo todas las proteínas enumeradas en la tabla 4A.
- En ciertas formas de realización, la una o más proteínas incluyen una proteína seleccionada de la tabla 4B. Se puede evaluar cualquier número de proteínas enumeradas en la tabla 4B, incluyendo 1 o más, 3 o más, 5 o más, e incluyendo todas las proteínas enumeradas en la tabla 4B.
- En ciertas formas de realización, la una o más proteínas incluyen una proteína seleccionada de la tabla 4C. Se puede evaluar cualquier número de proteínas enumeradas en la tabla 4C, incluyendo 1 o más, 3 o más, 5 o más, e incluyendo todas las proteínas enumeradas en la tabla 4C.

En ciertas formas de realización, la una o más proteínas incluyen una proteína seleccionada de la tabla 5A. Se puede evaluar cualquier número de proteínas enumeradas en la tabla 5A, incluyendo 1 o más, 3 o más, 5 o más, e incluyendo todas las proteínas enumeradas en la tabla 5A.

5

Las siguientes formas de realización están particularmente previstas para la presente descripción:

Forma de realización 1. Un método para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto está experimentando una respuesta de rechazo agudo (AR), comprendiendo el método:

10

evaluar el nivel de una pluralidad de biomarcadores en una muestra de un sujeto que ha recibido un aloinjerto para obtener una firma de biomarcador, en el que la pluralidad de biomarcadores comprende un biomarcador dentro de una ruta seleccionada de entre el grupo que consiste en ciclo celular, respuesta inmunitaria humoral, hematopoyesis, muerte celular, y estructura y desarrollo de tejido linfóide; y

15

determinar si el sujeto está experimentando una respuesta de AR en base a la firma del biomarcador.

Forma de realización 2. El método de la forma de realización 1, en el que dicho biomarcador está dentro de una ruta de señalización de respuesta de fase aguda.

20

Forma de realización 3. El método de la forma de realización 1, en el que dicho biomarcador está dentro del sistema de coagulación.

Forma de realización 4. El método de la forma de realización 1, en el que dicho biomarcador está dentro del sistema del complemento.

25

Forma de realización 5. El método de la forma de realización 1 comprende además evaluar el nivel de un biomarcador dentro de una ruta de señalización de respuesta de fase aguda, un biomarcador dentro del sistema de coagulación, y un biomarcador dentro del sistema del complemento.

30

Forma de realización 6. El método de la forma de realización 5, en el que dicha muestra es una muestra de orina.

Forma de realización 7. El método de la forma de realización 1, 5 o 6, en el que dicho aloinjerto es un aloinjerto de riñón.

35

Forma de realización 8. El método de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que el uno o más biomarcadores comprenden CD44, preferentemente en el que se determina que el sujeto está experimentando una respuesta de AR cuando el nivel de proteína CD44 en una muestra de orina disminuye en comparación con una firma de proteína de referencia de control de no AR.

40

Forma de realización 9. El método de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que el uno o más biomarcadores comprenden además UMOD y PEDF, preferentemente en el que se determina que el sujeto está experimentando una respuesta de AR cuando el nivel de proteína UMOD en una muestra de orina disminuye y el nivel de proteína PEDF en la muestra de orina aumenta en comparación con una firma de proteína de referencia de control de no AR.

45

Forma de realización 10. El método de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que el uno o más biomarcadores comprenden además MMP7, SERPING1, COL1A2, COL3A1 y TIMP1.

50

Forma de realización 11. El método de la forma de realización 1, en el que el aloinjerto es un aloinjerto de riñón, en el que la muestra es una muestra de orina, y en el que la firma del biomarcador comprende datos de nivel de proteína, en el que se determina que el sujeto está experimentando AR: (i) cuando están presentes niveles significativos de uno o más de HLA-DBP, IgHM, C4BPA, KIAA1522, HLA-DR, MYL6B, SUMF2, y HLA-DQB1; (ii) cuando el nivel de uno o más de CP, C5, HBA1, KLK3, C2, HLA-DRA, KRT2, LOC65265, LOC652113, LOC652141, IGFBP2, LOC441368, y HBE1 aumenta significativamente en comparación con un control de sujeto de injerto estable (STA); y/o (iii) cuando el nivel de uno o más de AMBP, CUBN, PSAP, UMOD, AMY2A, FN1, FGA, FBN1, EGF, FBN1, PSAP, COL12A1, GAA, COL12A1, LGALS3BP, SPP1, GAA, NAGLU, LOC64213, QPCT, MGAM, MGAM, CLEC14A, IGHV1-69 disminuye significativamente en comparación con un control STA.

55

60

Forma de realización 12. El método de la forma de realización 1, en el que dicho biomarcador está regulado por STAT1.

Forma de realización 13. El método de la forma de realización 12, en el que dicho biomarcador se selecciona de entre el grupo que consiste en BASP1, CD6, CD7, CXCL10, CXCL9, INPP5D, ISG20, LCK, NKG7, PSMB9,

65

RUNX3 y TAP1.

5 Forma de realización 14. El método de la forma de realización 1, en el que el aloinjerto es un aloinjerto de riñón, en el que la muestra es una muestra de orina, y en el que la firma del biomarcador comprende datos de nivel de proteína, en el que la presencia de niveles significativos de uno o más proteínas HLA-DBP, IgHM, C4BPA, KIAA1522, HLA-DR, MYL6B, SUMF2, y HLA-DQB1 indica que el sujeto está experimentando AR.

10 Forma de realización 15. El método de la forma de realización 1, en el que dicho biomarcador es un gen expresado diferencialmente en monocitos.

15 Forma de realización 16. El método de la forma de realización 15, en el que dicho biomarcador se selecciona de entre el que consiste en DUSP1, NAMPT, PSEN1, MAPK9, NKTR, RYBP, RNF130, IFNGR1, ITGAX y CFLAR.

20 Forma de realización 17. El método de la forma de realización 1, en el que la firma del biomarcador es un perfil de expresión génica del tejido de biopsia de trasplante de órgano sólido del sujeto, en el que se determina que el sujeto está experimentando AR cuando uno o más genes en la tabla 1 se sobreexpresan.

25 Forma de realización 18. El método de la forma de realización 1, en el que la firma del biomarcador es un perfil de anticuerpo de una muestra de suero, en el que se determina que el sujeto sufre una lesión crónica de aloinjerto (CAI) cuando los anticuerpos específicos para una o más proteínas en la tabla 5 aumentan significativamente.

30 Forma de realización 19. El método de la forma de realización 1, en el que el biomarcador se selecciona de entre el que consiste en FCGR3A, PRRX1, PRSS1, RNPS1 y TLR8.

35 Forma de realización 20. El método de la forma de realización 1, en el que el biomarcador comprende un anticuerpo nHLA.

40 Forma de realización 21. El método de la forma de realización 19, en el que el anticuerpo se selecciona de entre el que consiste en CXCL9/MIG, CXC1L11/ITAC, IFN-Gamma, CCL21/6CKINE, GDNF, CSNK2A2, y PDGFRA.

45 Forma de realización 22. El método de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que dicha evaluación comprende determinar la expresión génica.

50 Forma de realización 23. El método de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que dicha evaluación comprende determinar los niveles de proteína.

55 Forma de realización 24. El método de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que se evalúan 3 o más biomarcadores.

60 Forma de realización 25. El método de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que se evalúan 5 o más biomarcadores.

65 Forma de realización 26. El método de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que se evalúan por lo menos 10 biomarcadores.

70 Forma de realización 27. El método de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que el valor p es inferior a 0.05.

75 Forma de realización 28. El método de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que la especificidad es superior a 80%.

80 Forma de realización 29. El método de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que la sensibilidad es superior a 80%.

85 Forma de realización 30. El método de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que la ROC es superior a 70%.

90 Forma de realización 31. El método de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que la AUC es superior a 70%.

95 Forma de realización 32. El método de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que el valor predictivo positivo es superior 70%.

Forma de realización 33. El método de cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que el valor predictivo negativo es superior a 70%.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo.

5

Experimental

Introducción

10 El rechazo agudo (AR) sigue siendo el factor de riesgo primario para el resultado del trasplante renal; el desarrollo de biomarcadores de diagnóstico no invasivos para AR es una necesidad insatisfecha. Se utilizó proteómica mediante técnica de análisis masivo que usa LC-MS/MS y ELISA para analizar un conjunto de 92 muestras de orina, de pacientes con AR, injertos estables (STA), proteinuria (NS), y controles sanos (HC). Se identificaron un total de 1446 proteínas urinarias junto con varias proteínas específicas de NS, específicas de trasplante renal, y
15 específicas de AR. La abundancia relativa de proteínas urinarias identificadas se midió mediante recuentos espectrales a nivel de proteína adoptando una estadística ponderada en el número de cambio, asignando un mayor peso para las proteínas observadas con mayor frecuencia. Se han identificado alteraciones en varias proteínas urinarias específicas en AR, principalmente relacionadas con los antígenos del MHC, la cascada del complemento y las proteínas de la matriz extracelular. Un subconjunto de proteínas (UMOD, SERPINF1 y CD44), se ha validado de forma cruzada adicionalmente mediante ELISA en un conjunto independiente de muestras de orina, para
20 determinar diferencias significativas en la abundancia de estas proteínas urinarias en AR. Este enfoque semicuantitativo, libre de etiquetas, para el muestreo del proteoma urinario en estados normales y patológicos proporciona un método robusto y sensible para la detección de proteínas urinarias para la monitorización clínica no invasiva en serie para el rechazo del injerto después del trasplante de riñón.

25

Se realizó un estudio piloto de 10 muestras normales, 40 muestras de orina de pacientes con síndrome nefrótico, así como pacientes con trasplante renal con función de injerto estable y AR comprobada por biopsia. El propósito del estudio fue determinar si se podían identificar diferencias específicas de fenotipo en muestras de orina de
30 pacientes con diferentes etiologías de lesión renal nativa y asociada a trasplante.

30

El beneficio de identificar biomarcadores proteómicos urinarios específicos del rechazo en orina es muy relevante. El trasplante renal es el tratamiento definitivo para pacientes con enfermedad renal en etapa terminal 14, pero actualmente no existen medios no invasivos para monitorizar el rechazo agudo del injerto. La biopsia renal es un procedimiento invasivo que sufre de heterogeneidad de muestreo, tiene complicaciones asociadas de dolor, sedación, hematuria, fístulas arteriovenosas, trombosis del injerto y riesgo de transfusión, y correlaciona mal con la respuesta al tratamiento y el pronóstico. Debido a la capacidad de la orina para reflejar tanto los procesos locales dentro del riñón como el reflejo de los cambios dentro del plasma, la orina es particularmente útil para diagnosticar enfermedades renales y disfunción del trasplante de riñón (Clin Chim Acta 2007, 375, (1-2), 49-56). El descubrimiento de un biomarcador de orina para evaluar el estado de rechazo de los pacientes después del trasplante de riñón podría mejorar significativamente los resultados del paciente y disminuir el coste de la atención.

40

Para probar la validez del descubrimiento proteómico para biomarcadores específicos de AR mediante el presente enfoque de estudio, se realizaron ensayos ELISA en biomarcadores de proteínas seleccionados utilizando un conjunto independiente de 52 orinas de pacientes individuales. Los resultados de ELISA establecieron que el enfoque adoptado en este estudio es una forma viable de descubrir biomarcadores potenciales. Este informe demuestra cómo el descubrimiento basado en la MS de alto rendimiento, alto coste y mano de obra, puede eventualmente convertirse en un ensayo de diagnóstico económico, de cambio rápido, y clínicamente aplicable para pacientes trasplantados.

45

50 Materiales y métodos

Materiales:

Los siguientes reactivos se usaron para la preparación de la muestra proteómica: agua de calidad nanopura o Milli-Q (~18 megaohmios·cm o mejor); el kit de ensayo de ácido bicinonínico (BCA) se adquirió de Pierce (Rockford, IL); se obtuvieron tubos de filtración centrífuga Amicon Ultra a partir de Millipore (Bedford, MA); el bicarbonato de amonio, el formiato de amonio y el ácido fórmico se obtuvieron de Fluka (St. Louis, MO); Tris.HCl, urea, tiourea, ditiotreitól (DTT), yodoacetamida, cloruro de calcio, y ácido trifluoroacético (TFA), se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); metanol de grado HPLC (MeOH) y acetonitrilo de grado HPLC (CH₃CN) se adquirieron de Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ); el 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) se obtuvo de Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, WI); y la tripsina modificada de grado de secuenciación se adquirió de Promega (Madison, WI). El kit PEDF ELISA se adquirió de Bioproducts MD (Middletown, MD).

60

Muestras:

Cuarenta muestras de orina individuales y clínicamente anotadas se incluyeron en el estudio. Se utilizaron 10

65

pacientes de trasplante renal, cada uno con rechazo agudo comprobado por biopsia (AR) y 10 pacientes de trasplante renal con injertos estables comprobados por biopsia (STA). Los presentes controles incluyeron 10 pacientes con proteinuria no específica (NS) y 10 niños sanos de edad similar como controles sanos (HC). Se compararon los datos demográficos de los pacientes. Las muestras se recolectaron entre enero de 2005 y junio de 2007, y se obtuvieron como parte de un estudio en curso aprobado por el IRB en la Stanford University. La aprobación para la realización de esta investigación se obtuvo de Institutional Review boards en Stanford University y Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) de acuerdo con las regulaciones federales.

Recogida de orina, procesamiento inicial y almacenamiento:

La segunda mañana, se recogieron muestras de orina de la parte intermedia de la micción (50-100 ml) en recipientes estériles, y se centrifugaron a 2000 × g durante 20 minutos a temperatura ambiente dentro de 1 hora de la recogida. El sobrenadante se separó del sedimento que contenía cualquier materia en partículas, incluyendo células y restos celulares. El pH del sobrenadante se ajustó a 7.0, y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

Recuperación y cuantificación de proteínas urinarias:

Las proteínas urinarias se aislaron eliminando péptidos de pequeño MW y otros pigmentos (<10 kDa) filtrando el sobrenadante a través de tubos de filtración centrífuga Amicon Ultra (Millipore, Bedford, MA). Los tubos se preequilibraron con 10 ml de agua Milli-Q, y se centrifugaron a 3000 × g durante 10 minutos a 10°C utilizando rotores de cubos oscilantes. Después del equilibrio, se centrifugaron 10 ml de sobrenadante de orina durante 20 minutos a 3000 × g a 10°C. El filtrado se recuperó y se guardó para análisis peptidómico. El retenido se lavó dos veces con 10 ml de Tris-HCl 20 mM (pH 7.5). El volumen final del retenido se llevó hasta 400 µl con Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), y se cuantificó usando el ensayo de proteína de ácido bicinónico (BCA) (Pierce, Rockford, IL). Después de la cuantificación de muestras individuales, se prepararon 4 muestras reunidas para cada categoría de AR (rechazo agudo), STA (estable), NS (proteinuria no específica; síndrome nefrótico) y HC (control sano), utilizando 200 µg de cada muestra individual en cada categoría.

Preparación de muestras proteómicas urinarias:

Las muestras se desalaron utilizando filtros centrífugos Micron Ultracel YM-3 MWCO 3000 (Millipore, Billerica, MA) antes de la digestión triptica, siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración de proteína se verificó después del intercambio de amortiguador usando un ensayo de proteína BCA. Con fines de control de calidad, se añadió una mezcla de 3 proteínas estándar, adquiridas individualmente de Sigma-Aldrich (apomioglobina de caballo, gluceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de conejo, y ovoalbúmina bovina). Las proteínas se desnaturalizaron en bicarbonato de amonio 50 mM, pH 7.8, urea 8 M durante 1 h a 37°C, y después se redujeron con DTT 10 mM a 37°C durante 1 h. Después de esto, se alquilaron con yodoacetamida 40 mM a temperatura ambiente durante 1 h en ausencia de luz. Las muestras se diluyeron 10 veces con bicarbonato de amonio 50 mM, pH 7.8, y se añadió una cantidad suficiente de cloruro de calcio 1 M a las muestras para obtener una concentración de 1 mM en la muestra. La tripsina modificada de grado de secuenciación se preparó añadiendo 20 µl de bicarbonato de amonio 50 mM, pH 7.8, a un vial que contenía 20 µg de tripsina, y después de 10 minutos de incubación a 37°C se usó para la digestión de las muestras. La digestión triptica se realizó durante 3 h a 37°C con una relación de tripsina a proteína de 1:50 (p/p). La congelación rápida de las muestras en nitrógeno líquido paralizó la digestión enzimática.

Las muestras digeridas se desalaron usando una columna C18 de extracción en fase sólida (SPE) (Discovery DSC-18, SUPELCO, Bellefonte, PA) acondicionada con MeOH y enjuagada con TFA al 0.1%, 1 ml, y lavada con 4 ml de TFA al 0.1%/CH₃CN al 5%. Los péptidos se eluyeron de la columna SPE con 1 ml de TFA al 0.1%/CH₃CN al 80%, y se concentraron en Speed-Vac SC 250 Express (Thermo Savant, Holbrook, NY) hasta un volumen de ~50-100 µl. La concentración de péptido se midió usando el ensayo de proteína BCA. Las muestras digeridas se almacenaron a -80°C hasta que se necesitaron para análisis o procesamiento adicional.

Fraccionamiento de intercambio catiónico fuerte (SCX):

Las muestras digeridas (200.0 - 350.0 µg) se reconstituyeron con 900 µl de formiato de amonio 10 mM, pH 3.0/CH₃CN al 25%, y se fraccionaron por cromatografía de SCX en una columna de Polisulfoetilo A 2.1 mm × 200 mm, 5 µm, 300 Å con columna de guarda de 2.1 mm × 10 mm (PolyLC, Inc., Columbia, MD) utilizando un sistema de HPLC Agilent serie 1100 (Agilent, Palo Alto, CA). El caudal fue 200 µl/min, y las fases móviles fueron formiato de amonio 10 mM, pH 3.0/CH₃CN al 25% (A), y formiato de amonio 500 mM, pH 6.8/CH₃CN al 25% (B). Después de cargar 900 µl de muestra en la columna, la fase móvil se mantuvo al 100% de A durante 10 minutos. Los péptidos se separaron entonces usando un gradiente de 0 a 50% de B durante 40 min, seguido de un gradiente de 50-100% de B los siguientes 10 min. La fase móvil se mantuvo al 100% de B durante 10 minutos, seguido de enjuague con H₂O durante los siguientes 20 minutos, y reacondicionamiento final con A durante 10 minutos. Se recogió un total de 60 fracciones durante 90 minutos de separación para cada muestra agotada, y cada fracción se secó a vacío en Speed-Vac. Las fracciones se disolvieron en 25 µl de bicarbonato de amonio 25 mM, pH 7.8, y se combinaron en 32 fracciones para el análisis de LC-MS/MS. Las primeras 20 fracciones se combinaron en una, y se desalaron por la columna C18 SPE (Discovery DSC-18, SUPELCO, Bellefonte, PA), las siguientes 30

fracciones no se reunieron, y cada una se analizó por separado, y 5.0 µl de cada una de las últimas 10 fracciones se combinaron en la fracción número 32. Se analizó una alícuota de 5.0 µl de cada fracción mediante LC-MS/MS capilar.

5 Análisis de LC-MS/MS capilar:

El sistema de HPLC consistió en una configuración personalizada de bombas de jeringa Isco Modelo 100DM de 100 ml (Isco, Inc., Lincoln, NE), válvulas Valco de 2 posiciones (Valco Instruments Co., Houston, TX), y un automuestreador PAL (Leap Technologies, Carrboro, NC), que permite el análisis de muestras totalmente automatizado en cuatro columnas de HPLC separadas (Anal Chem 2008, 80, (1), 294-302). Las columnas de HPLC capilar de fase inversa se fabricaron internamente empaquetando en forma de suspensión la fase estacionaria Jupiter C18 de 3 µm (Phenomenex, Torrance, CA) en una longitud de 60 cm de tubería capilar de sílice fundida de 360 µm o.d. x 75 µm i.d. (Polymicro Technologies Inc., Phoenix, AZ) que incorporó una pantalla de retención de 2.0 µm en una unión de 1/16" 75 µm i.d. (Valco Instruments Co., Houston, TX). La fase móvil consistió en ácido acético al 0.2% y TFA al 0.05% en agua (A) y TFA al 0.1% en CH₃CN al 90%/agua al 10% (B). La fase móvil se desgasificó mediante el uso de un desgasificador de vacío Degassex Modelo DG4400 en línea (Phenomenex, Torrance, CA). El sistema de HPLC se equilibró a 10k psi con 100% de fase móvil A, y después se cambió una válvula de selección de fase móvil 20 minutos después de la inyección, lo que creó un gradiente casi exponencial cuando la fase móvil B desplazó a A en un mezclador activo de 2.5 ml. Se usó una longitud de 30 cm de tubería de sílice fundida de 360 µm o.d. x 15 µm i.d. para dividir ~20 µl/min de flujo antes de que llegara a la válvula de inyección (bucle de muestra de 5 µl). El caudal dividido controlaba la velocidad del gradiente bajo condiciones de operación a presión constante (10k psi). El caudal a través de la columna de HPLC capilar fue ~900 nl/min. El espectrómetro de masas de trampa de iones lineal ThermoScientific LTQ (ThermoScientific, San José, CA) se acopló con el sistema de LC utilizando una interfaz interna de ionización por electropulverización (ESI) para todos los análisis de muestras. Se utilizaron emisores de electropulverización grabados químicamente de 150 µm o.d. x 20 µm i.d. construidos por nosotros (Anal Chem 2006, 78, (22), 7796-801). La temperatura capilar calentada y el voltaje de pulverización fueron 200°C y 2.2 kV, respectivamente. Los datos se adquirieron durante 90 minutos, comenzando 30 minutos después de la inyección de la muestra (10 minutos en gradiente). Los espectros completos (configuración AGC: 3x10⁴) se recogieron de 400-2000 m/z, seguidos de espectros de MS/MS de trampa de iones dependientes de datos (configuración AGC: 1x10⁴) de los diez iones más abundantes aplicando energía de colisión de 35%. Se aplicó un tiempo de exclusión dinámica de 60 s.

Identificación de péptidos y proteínas usando espectros de MS/MS:

Los péptidos se identificaron a partir de los espectros de MS/MS al compararlos con los péptidos pronosticados del archivo FASTA de proteínas de la base de datos del International Protein Index (IPI - European Bioinformatics Institute) humano (versión 3.20, publicado el 22 de agosto de 2006) que contiene 61,225 entradas de proteínas, utilizando algoritmo SEQUESTTM (J Am Soc Mass Spectrom 1994, 5, (11), 976-989). Se utilizó un archivo de parámetros estándar que permite una adición dinámica de oxidación al resto de metionina y una modificación estática (no variable) de carboxamidometilación al resto de cisteína, con una ventana de error de masa de 3 unidades Da para la masa precursora y 1 unidad Da para la masa de fragmentación. Se permitieron las búsquedas de todos los términos peptídicos posibles, es decir, no limitados por términos trópicos solamente. Las identificaciones de péptidos se consideraron aceptables si pasaban los umbrales determinados aceptables para el plasma humano Qian et al. (Mol Cell Proteomics 2005, 4, (5), 700-9) y pasaban un filtro adicional de una puntuación de PeptideProphet de por lo menos 0.7 (Anal Chem 2002, 74, (20), 5383-92). La puntuación de PeptideProphet es representativa de la calidad de la identificación de SEQUESTTM, y se basa en una combinación de XCorr, delCn, Sp, y un parámetro que mide la probabilidad de que la identificación ocurriera por azar. Las puntuaciones de PeptideProphet se normalizan a una escala de 0 a 1, siendo 1 el valor de confianza más alto.

50 Agrupación de proteínas:

Debido a la alta redundancia de las relaciones péptido a proteína inherentes a la base de datos IPI, se utilizaron 2 programas de agrupación de proteínas para consolidar las identificaciones de secuencia. Protein Prophet (Anal Chem 2003, 75, (17), 4646-58) usa las secuencias de péptidos identificadas para ponderar la probabilidad de que el péptido se origine a partir de una proteína particular. Cuando no se pueden determinar las distinciones de proteínas parentales, esas proteínas se agrupan y se les asigna un valor de índice.

Proteínas expresadas diferencialmente:

60 Los recuentos espectrales a nivel de proteína se obtuvieron sumando los recuentos espectrales a nivel de péptido. Para comparar cuantitativamente las abundancias relativas de proteínas entre diferentes grupos de muestras, consideramos la presencia o ausencia de una proteína particular en diferentes fenotipos. Para las proteínas que se identificaron en múltiples categorías, utilizamos un criterio de corte de ≥ 2 veces el cambio en la base logarítmica (2) del recuento espectral, comparándose por lo menos 5 recuentos espectrales en uno de los fenotipos.

65 Ensayos ELISA para la proteína Tamm-Horsfall (UMOD):

Se incluyeron un total de 60 muestras de orina (20 AR, 20 STA y 20 HC). Muestras de orina diluidas 200 veces en amortiguador de PBS. La orina diluida de 100 µl se incubó en placas Reacti-Bind de 96 pocillos durante la noche a 4°C. La placa se lavó 5 veces con amortiguador 1XPBS que contenía Tween 20 al 0.05%. Después, los pocillos se bloquearon mediante 100 µl de FCS al 25% en PBS para evitar la unión no específica del anticuerpo. Los pocillos se incubaron entonces con PAB anti-glicoproteína Tamm Horsfall diluido 1:3000 veces a temperatura ambiente durante 1 h. El color se desarrolló utilizando turbo-TMB (Pierce Inc, Rockford, IL) y se detuvo con 100 µl de H₂SO₄ 2 M, y la placa se leyó con el lector de microplacas SPECTRAMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

ELISA para el factor derivado del epitelio pigmentario - PEDF (SERPINF1) y CD44:

Se realizaron ensayos ELISA en sándwich para validar el nivel elevado observado de PEDF y CD44 en orina recogida de un conjunto independiente de pacientes y controles que incluyeron AR (n = 20), STA (n = 20), NS (n = 8 para PEDF y 6 para CD44), HC (n = 6).

ELISA de PEDF:

Para ello, se utilizó un kit ELISA para el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) (BioProducts, MD), y los reactivos se prepararon siguiendo el manual del fabricante. Brevemente, después de una etapa de optimización inicial para la dilución óptima de la orina, las muestras de orina se diluyeron (1:40) en diluyente de ensayo. La placa de ELISA con 100 µl de patrones y la muestra de orina diluida se incubó a 37°C durante 1 h. Después de la incubación, las placas se lavaron 5 veces con amortiguador de lavado de placas. Los pocillos se incubaron con 100 µl de anticuerpo detector de PEDF a 37°C durante 1 h, y se lavaron 5 veces con el amortiguador de lavado. A esta etapa le siguió la incubación de los pocillos con 100 µl de disolución de trabajo de estreptavidina peroxidasa.

ELISA de CD44:

Para ello, se utilizó un kit de ELISA para CD44 (ABCam Inc, Cambridge, MA), y los reactivos se prepararon siguiendo el manual del fabricante. Brevemente, después de una etapa de optimización inicial para la dilución óptima de la orina, las muestras de orina se diluyeron (1:1) en amortiguador de diluyente estándar. La placa de ELISA con 100 µl de patrones y la orina diluida se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de la incubación, las placas se lavaron 5 veces con disolución de lavado. La placa se incubó durante 30 minutos en todos los pocillos con 50 µl de anti-CD44 biotinilado diluido. La placa se lavó 5 veces con la disolución de lavado y se incubó con 100 µl de disolución de HRP en todos los pocillos durante 30 minutos. Esta etapa fue seguida de una etapa de lavado. Todos los ensayos se desarrollaron con sustrato TMB listo para uso, seguido de la adición de disolución de parada. Todas las placas fueron leídas por el lector de microplacas SPECTRAMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las concentraciones de proteínas se determinaron a partir de una curva patrón generada a partir de los patrones obtenidos con el kit.

Análisis de correlación entre los recuentos espectrales y la cantidad observada del ensayo ELISA:

Obtuvimos datos cuantitativos para UMOD, factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) y CD44 usando ensayos ELISA en un conjunto independiente de pacientes. Los datos cuantitativos obtenidos de ELISA se compararon con los datos del recuento espectral para cada proteína observada en la fase de descubrimiento utilizando la plataforma LC-MS/MS. Los valores p y los coeficientes de correlación de Pearson se calcularon utilizando el programa SAS® (SAS Corporate Statistics, Cary, NC).

Análisis de enriquecimiento y análisis de impacto de la ruta:

El análisis de enriquecimiento para las proteínas identificadas se realizó utilizando Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com>). Se utilizó una lista de todos los genes humanos como referencia para calcular la significancia, que se obtuvo de la base de datos Onto-Tools (Bioinformatics 2006, 22, (23), 2934-9). El análisis de la ruta asimismo se realizó utilizando Pathway-Express (Bioinformatics 2009, 25, (1), 75-82 y Genome Res 2007, 17, (10), 1537-45). Pathway-Express realiza un novedoso análisis de impacto en las rutas de señalización, que además de la cantidad de proteínas en IPA, considera factores biológicos importantes tales como la topología de la ruta, la posición de la proteína en la ruta, la cantidad de cambio en la expresión de proteínas, y el tipo de interacción entre la proteína en cada ruta.

Resultados

La detección de nuevas proteínas urinarias amplía la base de datos del proteoma urinario:

Utilizando proteómica mediante técnica de análisis masivo basada en LC-MS/MS en la orina de pacientes renales, así como en individuos sanos, se identificaron 1446 proteínas urinarias. Los criterios para una identificación positiva de proteínas fueron un mínimo de 2 péptidos únicos, no redundantes, por proteína que se debe identificar; de este

modo, la FDR para las identificaciones de proteínas es ~0.1% basado en la búsqueda en la base de datos señuelo, mientras que la FDR a nivel de péptido único es ~3.0%. Identificamos 1001, 1159, 1325 y 1340 proteínas respectivamente en orina AR, NS, STA, y HC, respectivamente (figura 3). Usando una base de datos disponible a través de Ingenuity Pathway Analysis -IPA (Ingenuity $\square \square$ Systems, Redwood City, CA-www(dot)ingenuity(dot)com) en proteínas predichas basadas en la base de datos del genoma humano (Nature 2001, 409, (6822), 860-921), se cartografiaron las proteínas identificadas con proteínas urinarias y proteínas de origen renal previamente comentadas. Un total de 756 proteínas urinarias de la presente lista de 1446 proteínas se han enumerado como proteínas urinarias (UP), lo que deja 690 proteínas en la presente lista de proteínas urinarias como nuevas proteínas urinarias etiquetadas como nuevas proteínas urinarias (NUP). Se comparó la lista de proteínas urinarias identificadas de individuos sanos en este estudio con 1543 identificadas por Adachi et al. (Genome Biol 2006, 7, (9), R80) y 1160 por Gonzales et al (J Am Soc Nephrol 2008). Este estudio ha añadido 560 nuevas proteínas en el proteoma urinario existente de orina sana.

Las proteínas urinarias están enriquecidas con proteínas extracelulares, y el complemento y la coagulación, la degradación de estructuras de glicano, la adhesión celular, y la interacción del receptor de ECM fueron las rutas principales:

La clasificación ontológica de genes (The Gene Ontology Consortium. Nat Genet 2000, 25, (1), 25-9) subagrupó las 1446 proteínas identificadas en 5 grupos principales; 279 eran proteínas citoplasmáticas, 325 eran proteínas extracelulares, 28 eran proteínas nucleares, 304 eran membrana plasmática, y 108 tenían una localización subcelular aún desconocida. De acuerdo con los resultados de los que se informa previamente (Genome Biol 2006, 7, (9), R80), se descubrió que las proteínas de membrana extracelular y plasmática estaban enriquecidas, y las proteínas nucleares estaban relativamente subrepresentadas en el proteoma de orina en comparación con el proteoma humano predicho de la base de datos del genoma humano (Nature 2001, 409, (6822), 860-921) (figura 4). El análisis hipergeométrico revela que el enriquecimiento para proteínas de origen extracelular ($p < 1.00E-6$) y la membrana plasmática en orina ($p < 3.00E-6$) es altamente significativo en comparación con el proteoma humano. Las principales rutas de representación fueron las cascadas del complemento y la coagulación ($P = 1.95E-12$), la degradación de estructuras de glicano ($P = 1.31E-11$), las moléculas de adhesión celular (CAMs) ($P = 1.77E-11$), la interacción del receptor de ECM ($P = 1.87E-11$), la comunicación celular ($P = 2.04E-11$), la adhesión focal ($P = 2.62E-11$), la guía del axón ($P = 2.86E-11$), la regulación del citoesqueleto de actina ($P = 4.97E-09$), la interacción citocina-receptor de citocina ($P = 3.26E-09$), la estirpe de células hematopoyéticas ($P = 4.89E-08$).

No existe un sesgo específico con respecto a las proteínas plasmáticas y renales en orina de pacientes renales y el agotamiento de receptores de ECM e integrinas en pacientes renales. Se identificaron 1420 proteínas detectadas en la orina de pacientes con función renal normal (HC y STA), mientras que solo se encontraron 1206 proteínas en pacientes con disfunción renal activa (AR y NS). No existe sesgo del estado de salud del riñón en términos de proteínas urinarias, sanguíneas y renales conocidas cuando se utiliza la anotación basada en Ingenuity Pathway Analysis®. Entre 1420 proteínas identificadas en HC y STA, 578, 463 y 434 proteínas combinadas fueron proteínas urinarias, sanguíneas y renales previamente conocidas. Entre 1206 proteínas identificadas en AR y NS, 504, 405 y 353 proteínas combinadas eran proteínas urinarias, sanguíneas y renales conocidas previamente.

Se identificaron únicamente 67 proteínas en orina sana (HC). La proteína 1 que contiene el dominio EH (EDH1) y la creatinina cinasa tipo B (CKB) fueron las dos proteínas más abundantes identificadas en este grupo. Entre estas proteínas, es conocido que un número significativo de proteínas está involucrado en la morfología celular (CEACAM6, CR1, CRYAB, ERK, GNA12, GNA13, GNAQ, KDR, NOS3, PAFAH1B1, PP1CB, PTPRF, RAB4A, RYR2), enfermedad metabólica y metabolismo de lípidos (ACO1, CD7, DDC, EHD1, EXTL2, FAM125A, FLRT3, LPHN3, MAN2A2, PPIC, RAB4B, RAB5B, SORD, VPS28, y VPS37D).

Los recuentos espectrales para las proteínas medidas por LC MS se compararon y se correlacionaron con la concentración calculada a partir de los ensayos ELISA en un conjunto independiente de muestras de orina de fenotipos similares a los utilizados en la fase de descubrimiento. Se observó una buena correlación entre los recuentos espectrales y los datos cuantitativos medidos a partir de ensayos cuantitativos de ELISA. Cuando se combinó la concentración total medida con el ensayo ELISA y se comparó con los recuentos espectrales para las muestras correspondientes, hubo una excelente correlación ($R^2 = 0.84$) con un valor $P < 0.0012$ (Tabla 7).

Tabla 7. Medida cuantitativa de THP, PEDF y CD44: La concentración de proteínas para estas proteínas se midió por ELISA y se correlacionó con la concentración obtenida con los datos del recuento espectral observados en LC MS sin etiqueta.

Nombre de la proteína	Muestras	Concentración medida mediante ensayos ELISA (ng/ μ l)				Recuento espectral
		Mínima	Máxima	Mediana	Media	
THP*	AR (n=20)	216.00	13000.00	4150	5504.50	126
THP	STA (n=20)	374.00	56828.00	10248	13951.90	374
THP	HC (n=20)	7424.00	66622.00	17865	19798.10	581
PEDF**	AR (n=20)	10.00	1357.00	327	395.95	75

PEDF	STA (n=20)	0.00	40.00	0	6.00	54
PEDF	HC (n=8)	0.00	30.00	10	10.00	15
PEDF	NS (n=6)	0.00	96.00	5	19.33	124
CD44	AR (n=20)	0.34	3.96	1.27	1.67	15
CD44	STA (n=20)	3.42	19.87	13.2	12.57	18
CD44	HC (n=6)	4.06	19.87	11.1	11.76	125
CD44	NS (n=6)	1.99	17.97	6.51	8.54	18
Correlación acumulativa entre todas las concentraciones y recuentos espectrales para 3 proteínas				Correlación	0.84	
				Valor <i>p</i>	<0.0012	
*THP: Proteína Tamm-Horsfall (UMOD)						
**PEDF: Factor derivado del epitelio pigmentario (SERPINF1)						

Expresión diferencial de proteínas en rechazo agudo (AR):

Se analizó la abundancia relativa de proteínas identificadas tanto en pacientes con trasplante renal con episodio de AR como en aquellos con injerto estable (STA). Hubo 9 proteínas que se identificaron solo en orina de AR pero no en orina de fenotipos HC, STA y NS, incluyendo antígeno de histocompatibilidad HLA clase II, DP (W4) cadena beta (HLA-DBP), antígeno de histocompatibilidad HLA clase II, DRB1-8 cadena beta (IgHM), cadena alfa de la proteína de unión a C4b (C4BPA), antígeno MHC clase II (HLA-DR), cadena ligera 1 de miosina (MYL6B), antígeno de histocompatibilidad HLA clase II DQ (3) cadena beta (HLA-DQB1) (tabla 4A), y un total de 68 proteínas que estaban ausentes en AR pero presentes en las categorías HC, STA y NS, que incluyeron isoforma 1 de melanotransferrina (MF12), isoforma 1 de proteína 2 de matriz extracelular relacionada con FRAS1 (FREM2), isoforma 2 de la proteína 2 de matriz extracelular relacionada con FRAS1 (ROR1), isoforma 2 de la proteína similar L1 de la molécula de adhesión celular neural (PLD3), proteína 1 del aparato de Golgi (CRYL1), y la ectoenzima degradante de la hormona liberadora de tirotrópina (TRHDE).

De su evaluación de recuentos espectrales, los 9 colágenos, COL5A3, COL4A2, COL1A2, COL27, COL1A1, COL15A1, COL6A1, COL12A1 identificados, disminuyeron en la orina de AR, incluyendo colagenasa tipo IV (MMP-9) y su inhibidor TIMP-1. Varios miembros de la familia SERPIN, SERPING, SERPINB12, SERPINB3, SERPINB4, disminuyeron en orina de AR, mientras que aumentaron dos miembros SERPINC1 y SERPINF1 (PEDF). Se descubrió que las proteínas que disminuyeron están involucradas en la interacción del receptor de ECM, la comunicación celular, y la degradación de la estructura de glicano (todas con $P \leq 0.0005$). Se utilizaron las proteínas que aumentaron en AR para generar un mapa de calor (Figura 5). La agrupación jerárquica colocó NS junto a AR en el mapa de calor, indicando que existe una lesión considerable involucrada en AR.

Verificación de proteínas asociadas a AR: proteína Tamm-Horsfall (UMOD), factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), y CD44

Para verificación, se realizó un ensayo ELISA en UMOD, PEDF y CD44 como nuevas proteínas urinarias específicas de AR. Se verificó la disminución de UMOD en pacientes con AR. El ensayo ELISA se realizó para UMOD urinaria sobre un conjunto de muestras de validación independiente con AR (n = 20), STA (n = 20) y HC (n = 20). La concentración media de UMOD en orina de AR ($5.50 \pm 0.85 \mu\text{g/ml}$) fue significativamente menor que la orina de injerto estable ($13.95 \pm 2.94 \mu\text{g/ml}$ ($P < 0.01$) y la orina de control normal sana ($19.80 \pm 2.71 \mu\text{g/ml}$) ($P < 0.001$) (figura 6A). En otro experimento, se observó una concentración elevada de PEDF en orina de AR en comparación con la orina recogida de la función de injerto estable y otros controles que incluían un control normal sano y pacientes proteinúricos inespecíficos. La concentración media de PEDF en orina de AR ($0.370 \pm 0.350 \text{ ng/ml}$) fue significativamente mayor que la orina de STA ($0.006 \pm 0.009 \text{ ng/ml}$ ($P = 0.0001$), orina de NS ($0.019 \pm 0.037 \text{ ng/ml}$) ($P = 0.005$), y orina de HC ($0.009 \pm 0.009 \text{ ng/ml}$) ($P = 0.005$) (figura 6B). Cuando se analizó CD44 en un conjunto de muestras independientes de muestras de orina individuales, se observó una disminución de la concentración de CD44 en orina de AR en comparación con la orina recogida de la función de injerto estable y otros controles que incluían un control normal sano y pacientes proteinúricos inespecíficos. La concentración media de CD44 en orina de AR ($1.67 \pm 1.17 \text{ ng/ml}$) fue significativamente menor que la orina de STA ($2.81 \pm 1.10 \text{ ng/ml}$ ($P = 0.0001$), orina de NS ($1.83 \pm 1.63 \text{ ng/ml}$) ($P = 0.005$), y orina de HC ($2.54 \pm 1.41 \text{ ng/ml}$) ($P = 0.005$) (figura 6C).

45 Discusión

El presente estudio describe la aplicación de proteómica mediante técnica de análisis masivo para expandir la base de datos de proteoma urinario normal sano existente, así como su uso en la identificación y verificación de 3 biomarcadores potenciales específicos para AR de trasplante renal. Como la orina es el biofluido más relevante para los esfuerzos de descubrimiento de biomarcadores para enfermedades renales, su análisis proteómico es muy relevante (Clin Transplant 2008, 22, (5), 617-623). La proteómica basada en la espectrometría de masas proporciona un medio rápido y preciso para obtener la identificación de proteínas de muestras complejas y permite la detección rápida de marcadores de enfermedad (Mol Cell Proteomics 2006, 5, (10), 1727-44). El trasplante renal se ha mantenido como el tratamiento óptimo para pacientes con enfermedad renal en etapa terminal (Pediatr

Nephrol 2005, 20, (7), 849-53). A pesar de que se ha informado de una mejora en la supervivencia a corto plazo de los injertos, la AR del trasplante renal sigue siendo el principal factor de riesgo para el deterioro funcional del injerto, el rechazo crónico y la pérdida del injerto. Por lo tanto, la identificación de biomarcadores específicos de AR es importante para la vigilancia y el tratamiento de pacientes y aloinjertos. En la presente memoria, se utilizó proteómica basada en LC-MS para investigar la orina de pacientes con trasplante de riñón, y se han descubierto biomarcadores de proteínas que proporcionan una forma de diagnosticar de manera efectiva y no invasiva el rechazo agudo. Para esta etapa de descubrimiento, se utilizó un enfoque de agrupamiento inicial para minimizar la heterogeneidad individual y de la enfermedad, con la verificación posterior de resultados seleccionados en muestras de orina independientes con fenotipos clínicos similares que alimentaron los agrupamientos del conjunto del descubrimiento.

Se han aplicado diferentes enfoques proteómicos para analizar el proteoma urinario en el pasado, lo que ha ayudado a construir una lista de proteínas urinarias identificadas hasta la fecha (Mol Cell Proteomics 2006, 5, (3), 560-2; Proc Natl Acad Sci USA 2004, 101, (36), 13368-73; Proteomics 2005, 5, (18), 4994-5001; Proteomics 2004, 4, (4), 1159-74; Genome Biol 2006, 7, (9), R80; J Am Soc Nephrol 2008). Los primeros estudios utilizaron técnicas basadas en gel para identificar un número relativamente menor de proteínas; mientras que el uso de LC-MS sin gel ha demostrado ser una forma eficiente de identificar un mayor número de proteínas. Adachi et al identificaron 1543 proteínas utilizando orina recogida de individuos sanos (Genome Biol 2006, 7, (9), R80). En un informe reciente, Gonzales et al identificaron 1160 a partir de exosomas urinarios humanos (J Am Soc Nephrol 2008) (resumido en la figura 7).

Se ha identificado un nuevo conjunto de proteínas urinarias con criterios estrictos de un mínimo de 2 péptidos únicos, no redundantes, por proteína, con ~0.1% de FDR para la identificación de proteínas. Como se resume en la figura 7, existe una superposición significativa entre la lista de proteínas identificadas por Adachi et al (Genome Biol 2006, 7, (9), R80) y Gonzales et al (J Am Soc Nephrol 2008), aunque existen nuevas proteínas identificadas en cada estudio, que eventualmente ayudará a construir una base de datos integral de proteoma urinario humano. Además de contribuir a la base de datos de proteínas urinarias existente, se han analizado las proteínas urinarias identificadas de controles normales sanos hasta el síndrome nefrótico y el trasplante renal que produjeron proteínas específicas relacionadas con la lesión renal asociada con el síndrome nefrótico, así como el trasplante renal que incluyó AR y la función de injerto estable.

Uno de los desafíos de la investigación traslacional es que existe un amplio intervalo (aproximadamente hasta 10 órdenes de magnitud) de concentración de proteína presente en el espécimen biológico, especialmente sangre y orina. El diseño experimental aplicado en este estudio ha proporcionado identificaciones de proteínas para proteínas altamente abundantes tales como UMOD con una concentración medida 5 órdenes de magnitud (~0.07 mg/ml) mayor que la concentración medida para la proteína A4 de unión a calcio S100 (~2 ng/ml) en orina. En este estudio se calcularon los recuentos espectrales como un medio semicuantitativo para la comparación, y se utilizó un cambio de número de veces ponderado para obtener una lista de proteínas biomarcadoras potenciales. Se probaron 3 proteínas cuya concentración difería en 4 órdenes de magnitud, mientras que había una correlación casi perfecta con una buena correlación de las proteínas que oscilan desde los recuentos espectrales medios 9 a 360 ($r^2 = 0.59-0.99$). Los datos sugieren que los datos de recuento espectral de LC-MS/MS sin etiqueta proporcionan una cuantificación relativamente buena para proteínas de abundancia alta a abundancia moderada. Si el recuento espectral es bajo, tiene una correlación pobre con la concentración real en la muestra, y puede requerir métodos de etiquetado más estrictos, tal como el método de etiquetado iTRAQ 35 o 180/160 (36) para lograr una cuantificación más precisa. En este estudio, se utilizaron recuentos espectrales como nuestra medida de abundancia relativa para enumerar las proteínas específicas de AR potenciales.

Dado el alcance del estudio, se tomaron tres candidatos de proteínas relevantes para verificar su validez como específicos de AR como se descubrió mediante el enfoque sin etiqueta usando LC-MS/MS. Dado que es conocido que el ensayo ELISA es robusto, sensible para realizar medidas cuantitativas de proteínas en un entorno simple a diferencia de MRM. Se realizó el ensayo ELISA en THP, PEDF y CD44 como nuevas proteínas urinarias específicas de AR. Se ha demostrado que el nivel reducido de THP y CD44 y el nivel elevado de PEDF en orina de AR podrían verificarse como un método altamente específico y sensible para detectar AR dentro del riñón trasplantado, independientemente del efecto de confusión de proteinuria, inmunosupresión, edad o género.

La proteína Tamm-Horsfall (asimismo conocida como uromodulina -UMOD) se localiza en las células epiteliales de las extremidades ascendentes gruesas del asa de Henle y en la parte más proximal del túbulo contorneado distal (37). Se sugiere que esta proteína está involucrada en la inhibición constitutiva de la cristalización de calcio (38). La mutación del gen UMOD se ha relacionado con la nefropatía hiperuricémica juvenil familiar (FJHN) y con la enfermedad renal cística medular autosómica dominante (MCKD2) en niños (J Med Genet 2002, 39, (12), 882-92), y asimismo se ha informado de que está involucrada en la prevención de la infección del aparato urinario (Eur J Clin Invest 2008, 38 Suppl 2, 29-38). Esta proteína ha intrigado a los nefrólogos durante mucho tiempo debido a su alta abundancia en orina sana sin un papel obvio (Nephron 2000, 85, (2), 97-102). Kaden et al observaron una reducción de la UMOD urinaria, un retraso en el inicio de la función trasplantada, y una mayor UMOD urinaria con recuperación de la salud renal (Urol Res 1994, 22, (3), 131-6). Sin embargo, no se recomendó el uso de UMOD como parámetro de diagnóstico. Sejdieu et al han relacionado recientemente la disminución de la UMOD en la

orina con el desarrollo de insuficiencia renal y muerte cardiovascular dentro de los 20 años en la diabetes tipo 1 pero no en la diabetes tipo 2 (Scand J Urol Nephrol 2008, 42, (2), 168-74). La presente observación del nivel reducido de proteína Tamm-Horsfall en AR está de acuerdo con el patrón de UMOD urinaria baja con injerto que funciona mal, y puede necesitar validarse aún más con una cohorte más grande de muestras de pacientes.

El precursor del factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) asimismo se conoce como inhibidor de la serpina peptidasa. El clado F (SERPINF) es miembro de los inhibidores de la serina proteasa, y es conocido que es un potente inhibidor de la angiogénesis en el ojo (Science 1999, 285, (5425), 245-8). PEDF se detectó como una de las proteínas cuyo nivel estaba elevado en la orina de AR. PEDF es uno de los principales inhibidores de la angiogénesis, y está involucrado en actividades fisiológicas que incluyen curación de heridas, lesión por isquemia-reperusión, y metástasis de cáncer, por nombrar unos pocos. A pesar de que no se ha establecido una correlación directa para PEDF en la lesión renal, en un informe reciente, Matsuyama et al observaron un aumento en el nivel de PEDF en el suero de pacientes diabéticos con retinopatía diabética y nefropatía, y han sugerido que esto podría ser un reflejo de daño microvascular (Mol Vis 2008, 14, 992-6). La presente observación del aumento del nivel de PEDF en la orina de AR podría proporcionar una nueva forma de monitorizar el estado de salud del trasplante renal y una investigación adicional para comprender el mecanismo subyacente relacionado con su participación en el AR.

La CD44 es una glicoproteína de la superficie celular, y es conocido que está involucrada en las interacciones célula-célula, la adhesión celular y la migración (Nat Rev Mol Cell Biol 2003, 4, (1), 33-45). Actúa como un receptor para el ácido hialurónico (HA), osteopontina, colágenos, y metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Mol Pathol 1999, 52, (4), 189-96). Se ha dado a conocer un amplio intervalo de actividades para esta proteína, que incluyen la activación de linfocitos, la recirculación y la localización, la hematopoyesis, y la metástasis tumoral. Los transcritos de este gen sufren un ajuste alternativo complejo que da como resultado muchas isoformas funcionalmente distintas; sin embargo, no se ha determinado la naturaleza completa de algunas de estas variantes. En un estudio separado en el laboratorio para investigar posibles biomarcadores de AR usando ELISA en suero, se ha observado que CD44 está aumentada en suero de AR ($p = 0.01$) con 65% de sensibilidad y 70% de especificidad (Chen et al, manuscrito enviado para publicación). La presente observación del nivel disminuido de esta proteína en la orina de AR tiene la tendencia opuesta al nivel sérico de CD44, y es interesante puesto que se puede hipotetizar que existe una alteración de la eficiencia de filtración glomerular de esta proteína en el momento del AR.

Los estudios genómicos o proteómicos de alto rendimiento no solo generan una lista de genes o proteínas específicos de la enfermedad, sino que asimismo ayudan a comprender las rutas y sucesos moleculares subyacentes. La actividad biológica y su asociación con diferentes rutas proporciona una mejor comprensión del suceso de rechazo agudo que generalmente se sabe que está mediado por las respuestas de las células T a los antígenos de los órganos donantes que son diferentes a los del receptor. Este estudio ha proporcionado una visión amplia de los sucesos subyacentes en el riñón en el momento del rechazo agudo. Se observa un aumento de las proteínas de MHC que están involucradas en la presentación de antígenos extraños a las células T.

Mediante el análisis de impacto en las rutas de señalización, se identificó un número de proteínas urinarias específicas de AR que forman parte de las cascadas de respuesta de fase aguda, complemento y coagulación. Por otro lado, existe una disminución significativa de proteínas involucradas con ECM, citoarquitectura en orina de AR en comparación con STA y controles sanos, lo que sugiere una renovación significativa de la matriz extracelular durante el episodio de AR.

Conclusión:

En resumen, en este primer informe de este tipo, se ha demostrado con éxito que la proteómica mediante técnica de análisis masivo es una forma viable de descubrir biomarcadores potenciales en el trasplante. El resultado de este estudio demuestra que la estrategia de análisis comparativo usando muestras agrupadas es una forma simple y efectiva de lograr una lista de biomarcadores potenciales que pueden rastrear con estados normales y de enfermedad. La validación cruzada de los resultados seleccionados de estos estudios, mediante un ensayo ELISA económicamente viable y conveniente, en un conjunto independiente de muestras de orina, demuestra la factibilidad de la traducción de este enfoque a la práctica clínica. En conclusión, este enfoque semicuantitativo, sin etiqueta, para analizar el proteoma urinario en estados normales y de enfermedad proporciona un método robusto y sensible para la detección de proteínas urinarias para la monitorización clínica no invasiva, en serie, para el rechazo del injerto después del trasplante de riñón.

Además del ejemplo anterior, ver Sigdel et al., "Shotgun proteomics identifies proteins specific for acute renal transplant rejection" Proteomics - Clinical Applications volumen 4, publicación 1, páginas 32 - 47, (incluyendo toda la información suplementaria recuperable a través de Internet, por ejemplo datos y tablas suplementarias).

Listado de secuencias

<110> The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University

ES 2 798 114 T3

<120> Biomarcadores de proteínas y de genes para el rechazo de trasplantes de órganos

<130> 1.824.013 EP-a

5 <140> US2011/030026
<141> 2011-03-25

<150> US61/341,071
<151> 2010-03-25

10 <150> US61/452,288
<151> 2011-03-14

<160> 12

15 <170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 13

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

25 Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Ser
1 5 10

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

f

<400> 2

35 Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Asn Leu Gly
1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Lys Gly Pro Arg Gly
1 5 10

45 <210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

50 <400> 4

Ala Pro Gly Asp Arg Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Pro
1 5 10

<210> 5

55 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

60 Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Ser
1 5 10 15

ES 2 798 114 T3

<210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 6

 Pro Gly Leu Pro Gly Gln Val Gly Glu Thr Gly Lys Pro Gly Ala Pro
 1 5 10 15
 Gly Arg
 10
 <210> 7
 <211> 18
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 7

 Gly Ile Lys Gly Glu Lys Gly Asn Pro Gly Gln Pro Gly Leu Pro Gly
 1 5 10 15
 Leu Pro
 20
 <210> 8
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 8

 Asn Gly Asp Asp Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Arg Pro Gly Glu Arg
 1 5 10 15
 Gly Pro Pro Gly Pro
 20
 30
 <210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 9

 Asp Gly Pro Pro Gly Arg Asp Gly Gln Pro Gly His Lys Gly Glu Arg
 1 5 10 15
 Gly Tyr Pro Gly
 20
 40
 <210> 10
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 400> 10

 Glu Ser Gly Arg Glu Gly Ala Pro Gly Ala Glu Gly Ser Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Asp Gly Ser Pro Gly Ala Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Pro Ala
 20 25 30
 45
 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens

 <400> 11

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

ES 2 798 114 T3

<210> 12

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 12

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

Thr Arg

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de determinación de si un sujeto que ha recibido un trasplante de riñón está experimentando una respuesta de rechazo agudo (AR), comprendiendo el método:
- (a) evaluar un nivel de expresión de uno o más genes en sangre periférica del sujeto, en el que los uno o más genes se seleccionan de entre: SLC25A37, MAP2K3, EPOR, ANK1, CHST11, LYST, RARA, PCTP, ABTB1, y RXRA, en el que SLC25A37 es un gen seleccionado; y
- 10 (b) determinar si el sujeto está experimentando una respuesta de AR sobre la base del nivel de expresión de los uno o más genes seleccionados.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dichos uno o más genes son dos o más genes.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, en el que dichos uno o más genes son tres o más genes.
4. Método según la reivindicación 1, en el que dichos uno o más genes son cinco o más genes.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que EPOR es un gen seleccionado adicional.
- 20 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sujeto es un adulto.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además comparar el nivel de expresión de los uno o más genes seleccionados con un perfil de expresión de referencia.
- 25 8. Sistema para determinar si un sujeto, que ha recibido un trasplante de riñón, está experimentando una respuesta de rechazo agudo (AR), comprendiendo el sistema:
- (a) uno o más reactivos para evaluar un nivel de expresión de uno o más genes en sangre periférica del sujeto, en el que los uno o más genes se seleccionan de entre: SLC25A37, MAP2K3, EPOR, ANK1, CHST11, LYST, RARA, PCTP, ABTB1, y RXRA, en el que SLC25A37 es un gen seleccionado; y
- 30 (b) un elemento de determinación de fenotipo para emplear el nivel de expresión de los uno o más genes seleccionados mediante unos medios informáticos adecuados para determinar si un sujeto que ha recibido un aloinjerto de órgano está experimentando una respuesta de AR, en el que el elemento de determinación de fenotipo comprende un valor de expresión de referencia para los uno o más genes seleccionados.
- 35 9. Sistema según la reivindicación 8, en el que dichos uno o más genes son dos o más genes.
- 40 10. Sistema según la reivindicación 8, en el que dichos uno o más genes son cinco o más genes.
11. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que EPOR es un gen seleccionado.
- 45 12. Utilización de un medio legible por ordenador que ha registrado un perfil de expresión de referencia, en la que el perfil de expresión de referencia incluye uno o más genes seleccionados de entre: SLC25A37, MAP2K3, EPOR, ANK1, CHST11, LYST, RARA, PCTP, ABTB1, y RXRA, en la que SLC25A37 es un gen seleccionado, y que comprende un producto de programa de ordenador que, cuando se ejecuta en un ordenador, hace que el ordenador lleve a cabo el método según la reivindicación 7 para determinar si un sujeto, que ha recibido un trasplante de riñón, está experimentando una respuesta de rechazo agudo (AR).
- 50

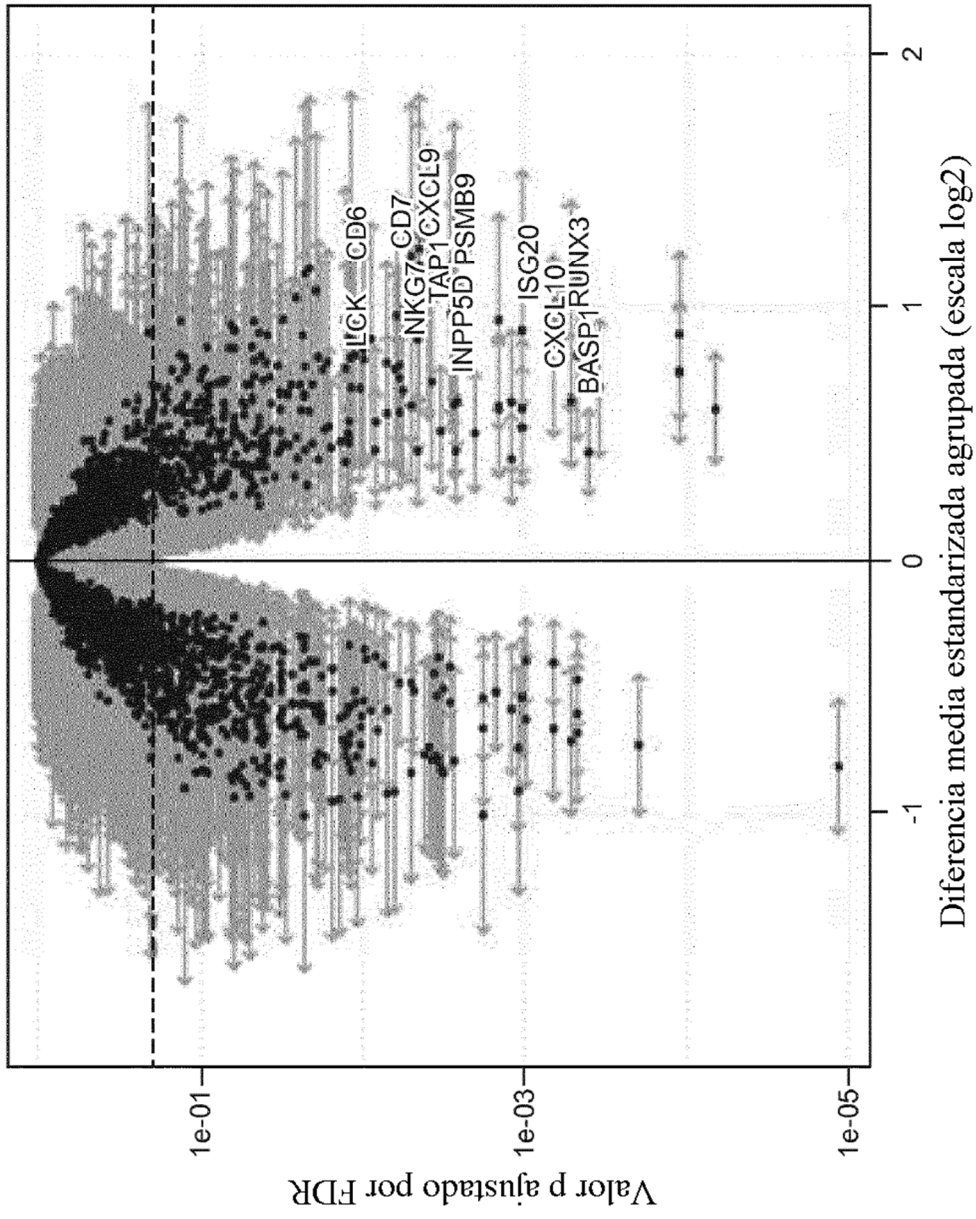


FIG. 1A

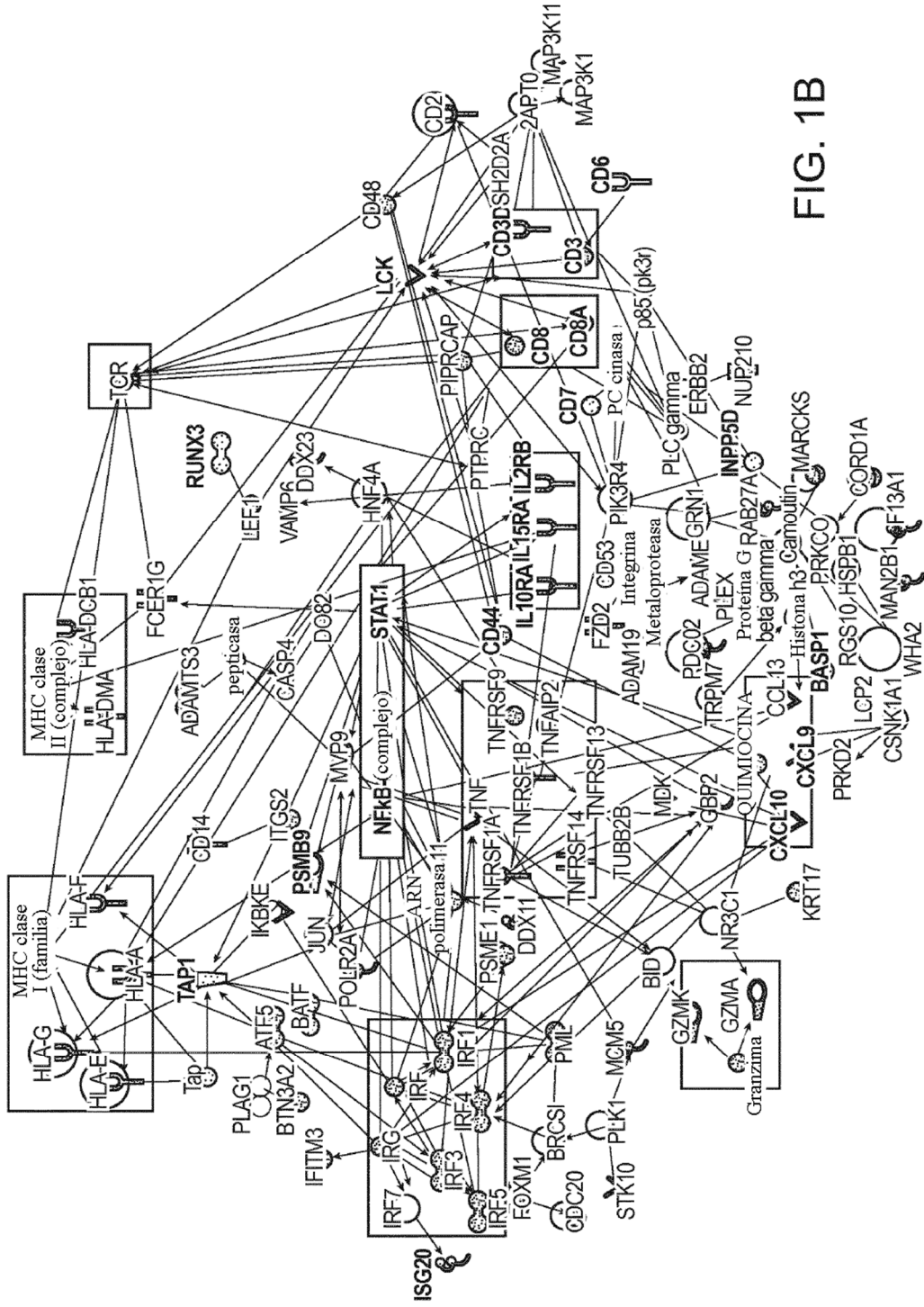


FIG. 1B

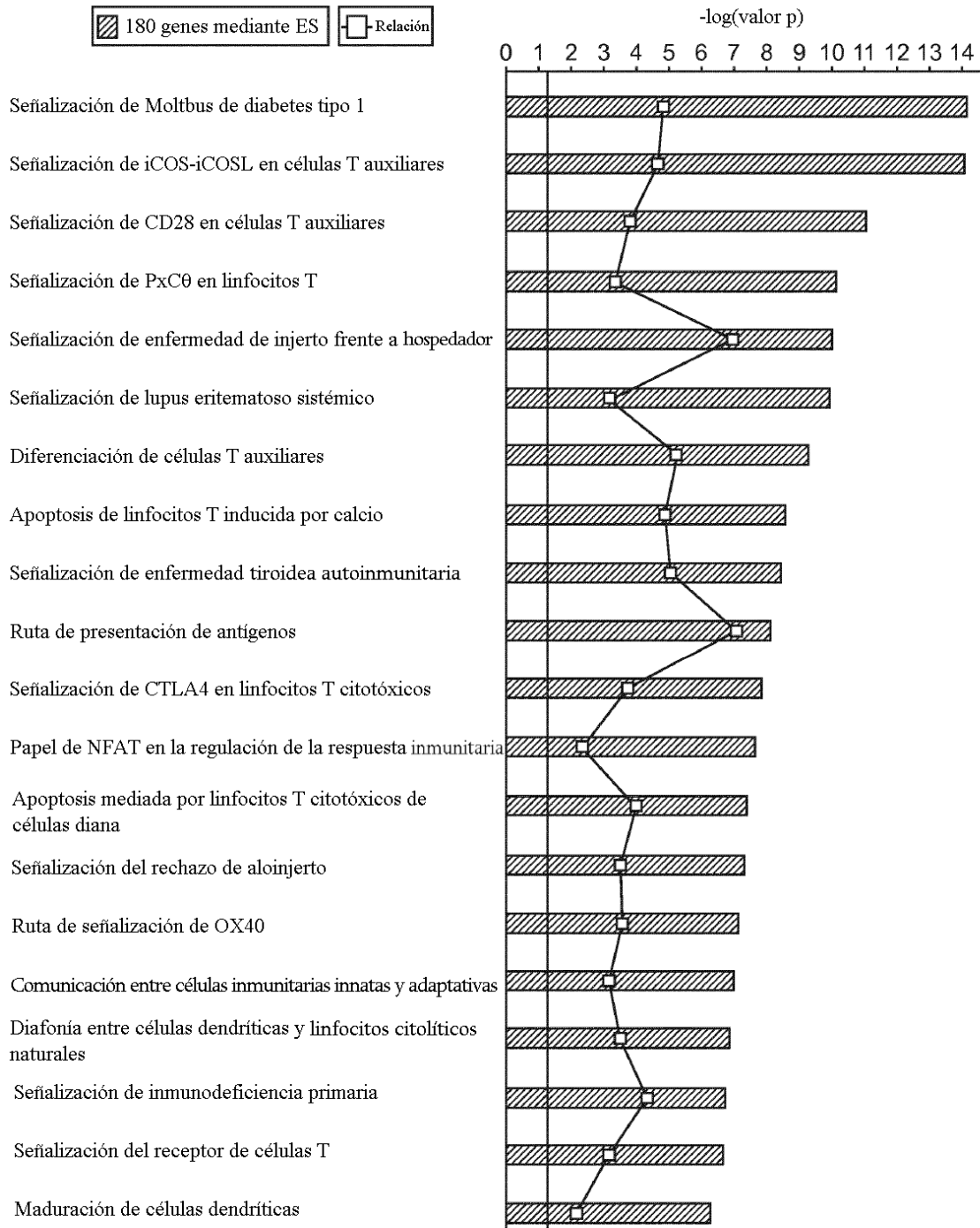


FIG. 1C

Tejido	Número de genes específicos de tejidos	Valor p (hipergeométrico)	FDR (Benjamini-Hochberg)
SANGRE COMPLETA	66	8.18E-35	1.49E-33
Células T CD4+	60	8.93E-22	1.30E-20
Células T CD8+	61	1.48E-20	1.80E-19
Monocitos PB-CD14+	58	7.48E-20	7.80E-19
Linfocitos NK PB-CD56+	65	2.02E-19	1.85E-18
Médula ósea	27	3.96E-18	2.89E-17
Células dendríticas PB-BDCA4+	64	2.22E-17	1.47E-16
Mieloide BM-CD33+	59	3.18E-17	1.94E-16
Células B PB-CD19+	49	6.89E-13	3.59E-12
Linfoblastos_B_721	54	4.24E-08	1.72E-07
BM-CD34+	46	1.09E-07	4.20E-07
Endotelial BM-CD105+	27	6.04E-03	1.70E-02

FIG. 1D

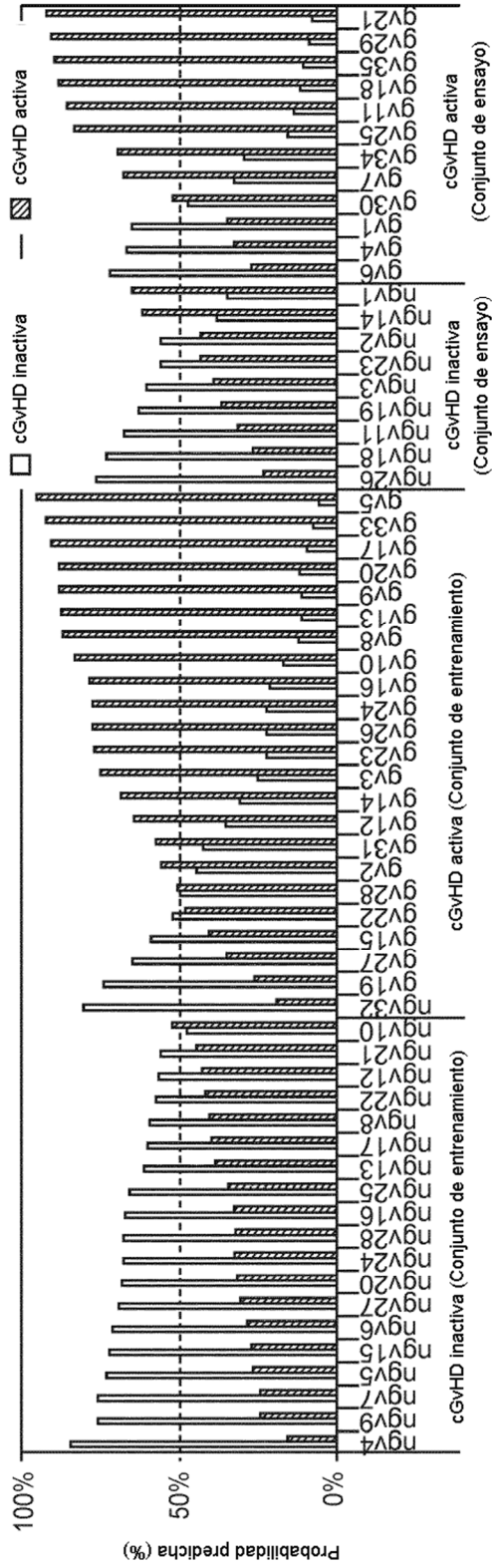


FIG. 2A

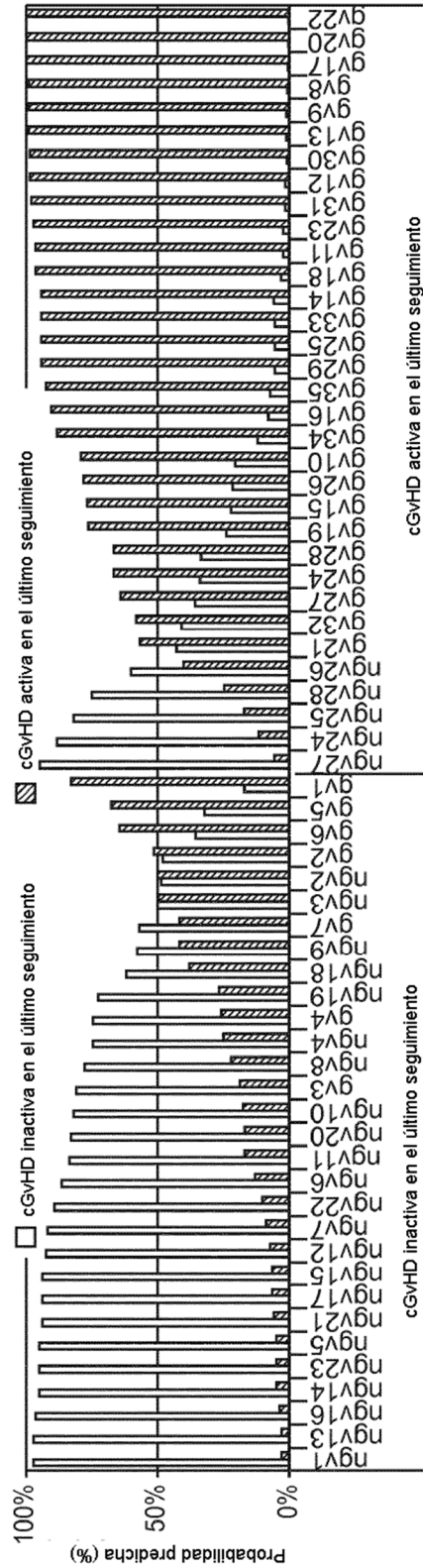


FIG. 2B

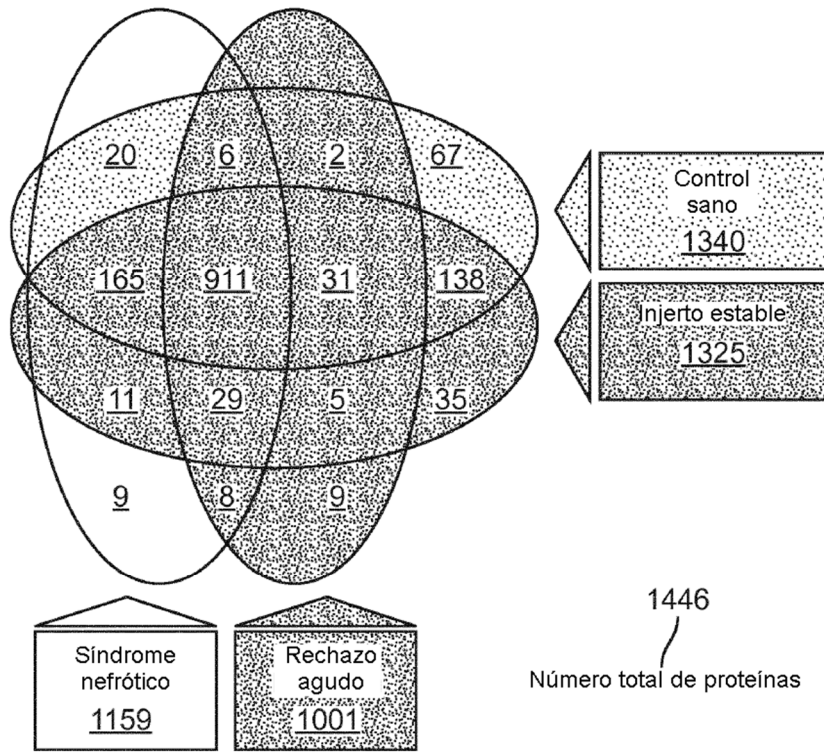


FIG. 3

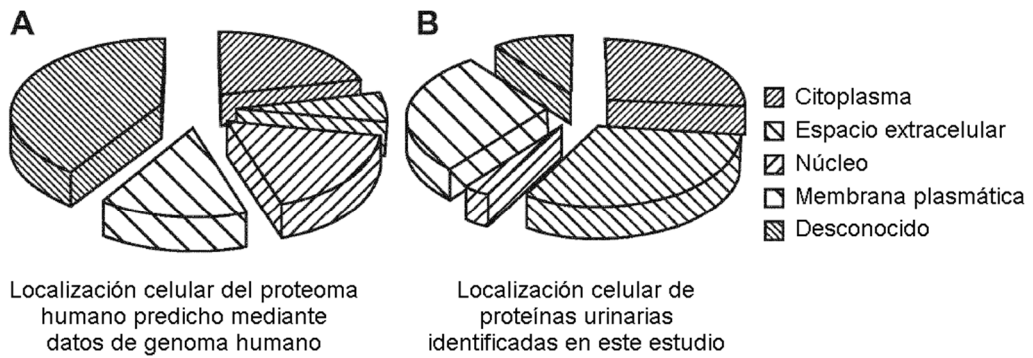


FIG. 4

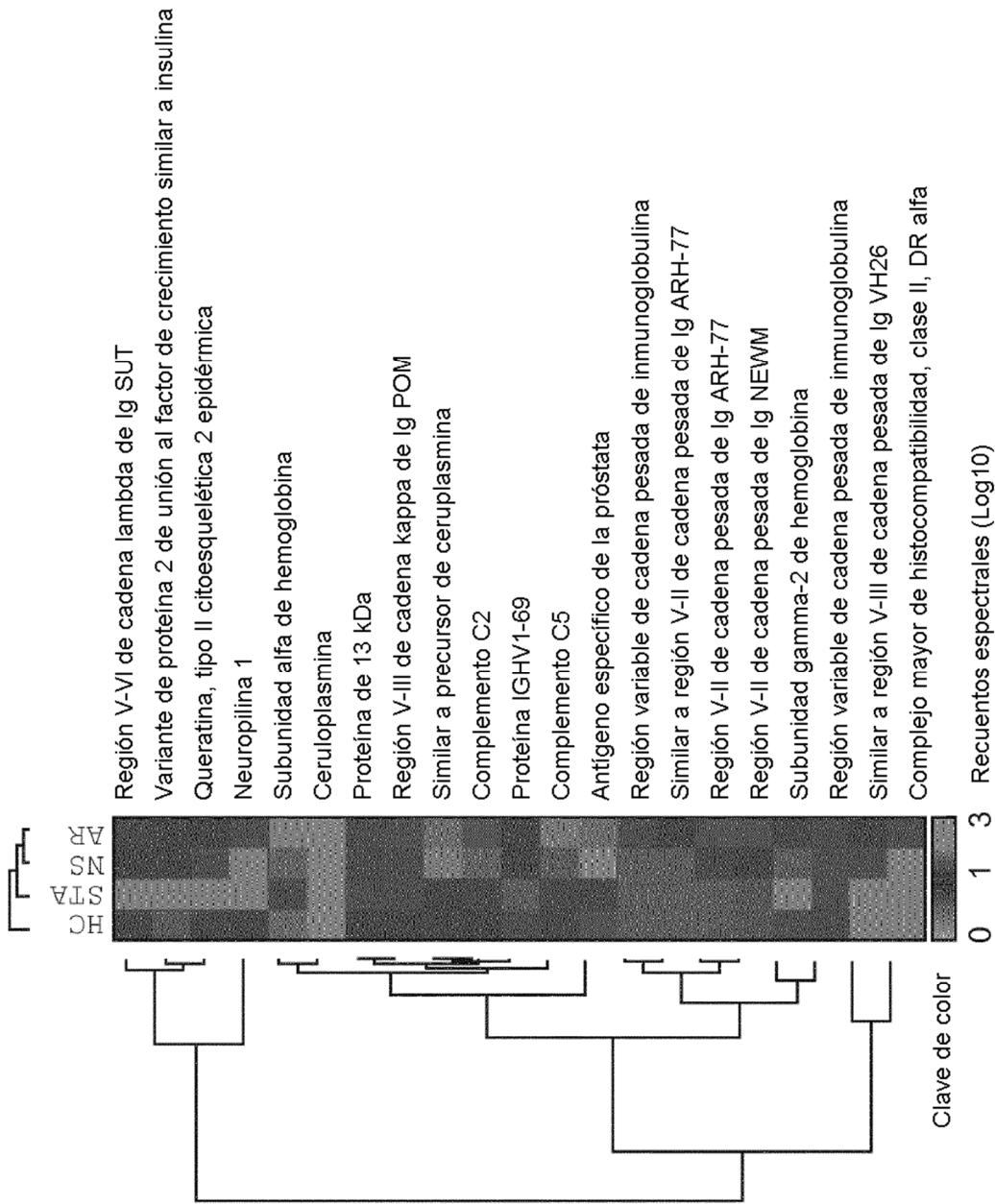


FIG. 5

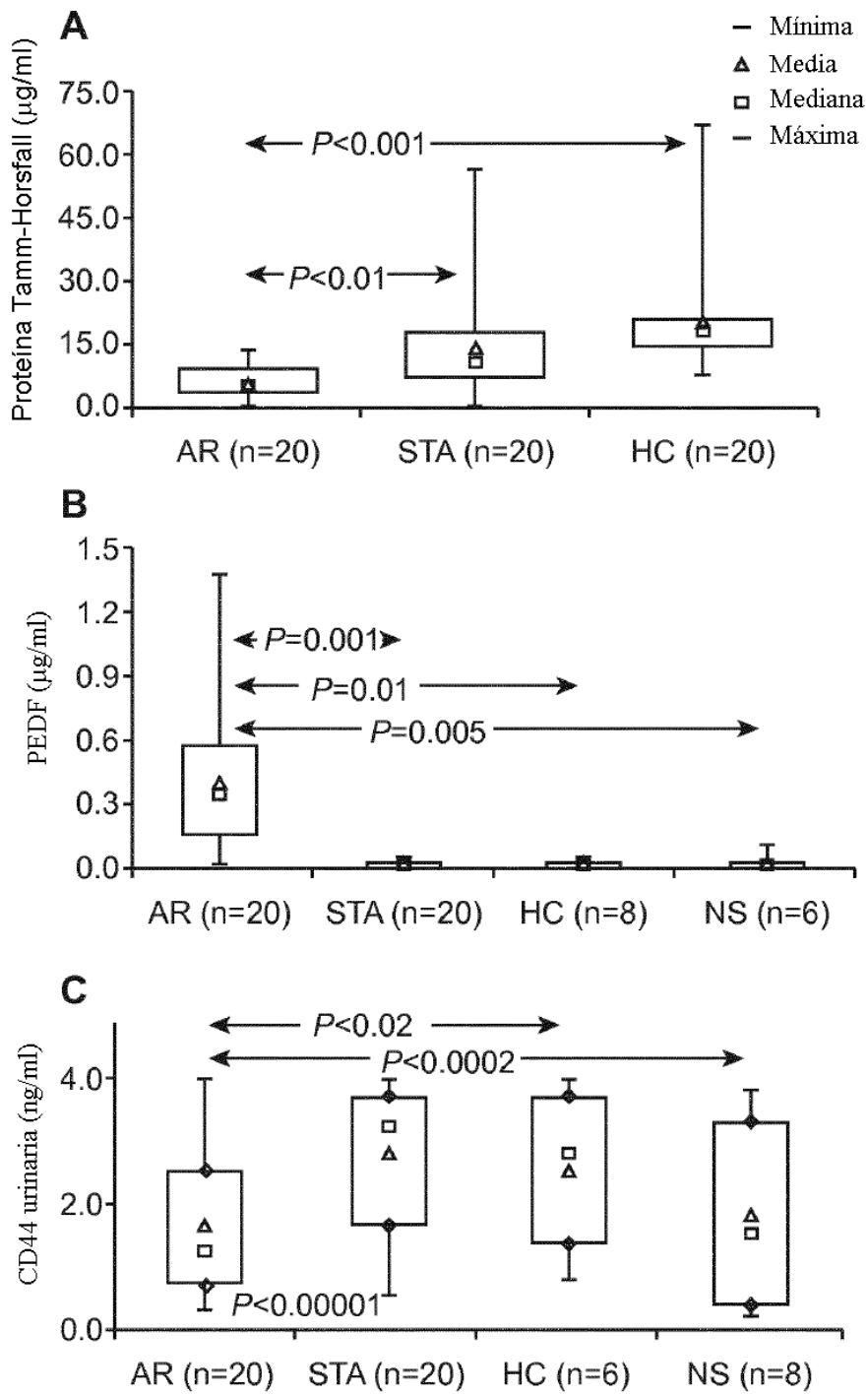


FIG. 6

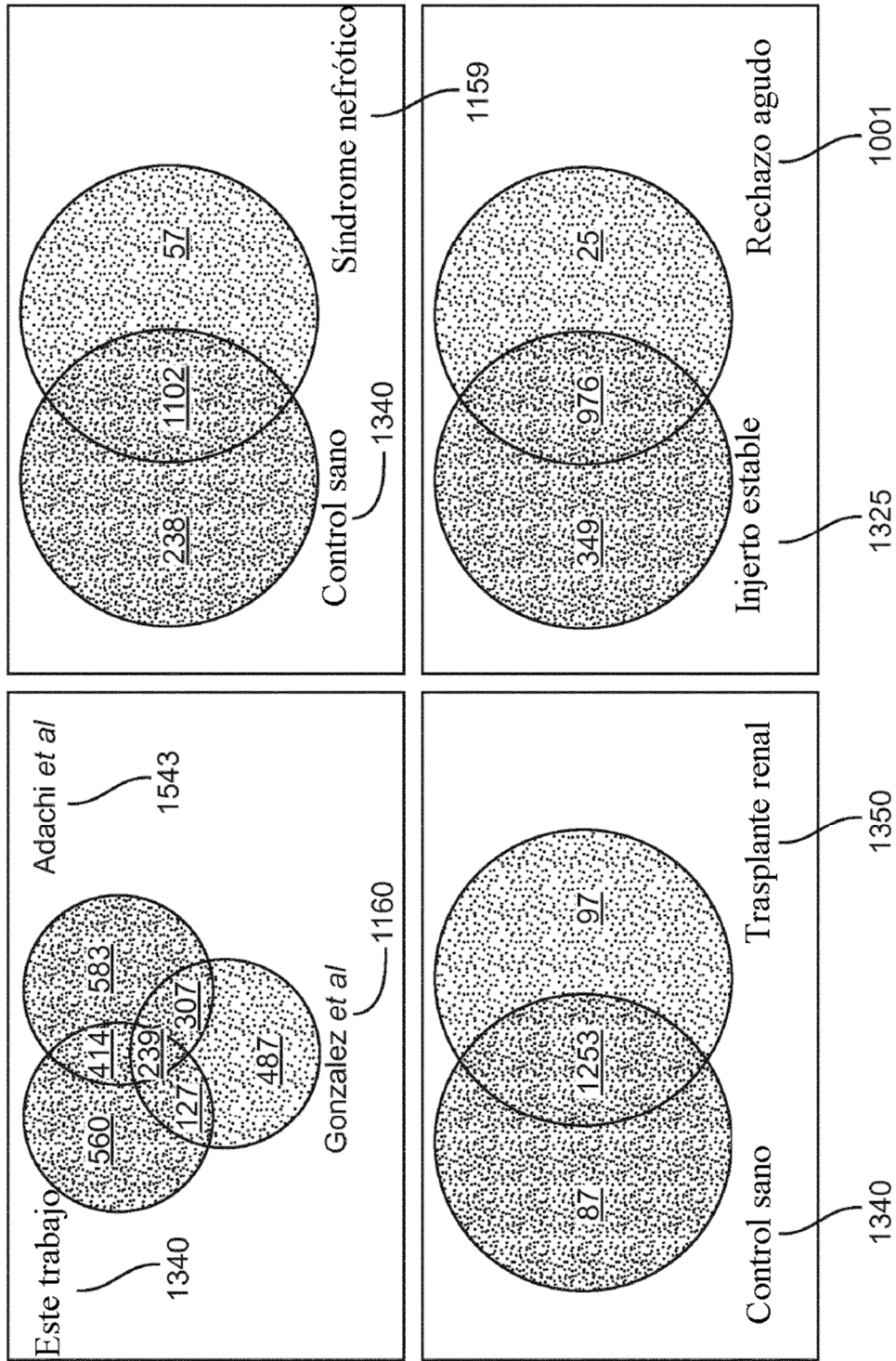


FIG. 7