

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 756**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2018 PCT/EP2018/056414**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2018 WO18167157**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2018 E 18714723 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024 EP 3596476**

54 Título: **Uso de un conjunto de marcadores para determinar el riesgo de rechazo de riñón**

30 Prioridad:

15.03.2017 DE 102017105566

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

24.06.2024

73 Titular/es:

**NUMARES AG (100.0%)
Am BioPark 9
93053 Regensburg, DE**

72 Inventor/es:

**EIGLSPERGER, JOHANNES;
NEUMANN, SINDY;
PAGEL, PHILIPP;
ZUCKER, MAXIMILIAN y
PFAHLERT, VOLKER**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 973 756 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

Uso de un conjunto de marcadores para determinar el riesgo de rechazo de riñón

- 5 La presente invención se refiere al uso *in vitro* de un conjunto de marcadores para determinar el riesgo de rechazo de riñón de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1, para el uso diagnóstico *in vivo* del mismo conjunto de marcadores de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 9 y a un método para analizar una muestra de orina aislada *in vitro* de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 10.
- 10 Es de gran interés médico determinar el riesgo de rechazo de riñón después del trasplante de riñón mediante un método fácilmente aplicable. Con este propósito, el documento WO 2012/045773 A9 divulga determinadas sustancias que son muy adecuadas para determinar el riesgo correspondiente de rechazo de riñón, tal como el malonato de metilo, lactato, succinato de metilo, p-cresol, 3-hidroxi isovalerato, citrato, metil guanidina, malonato, taurina, metil guanidina, fenil acetil glicina, trigonelina, α-glucosa, acetil carnitina, fenilacetato e hipurato.
- 15 También el documento US 9.541.620 B2 divulga ciertas sustancias que podrían usarse para determinar el riesgo de rechazo de riñón. De este modo, se enfoca en el N-óxido de trimetilamina (TMAO) como biomarcador más potente.
- 20 El documento WO 2002/010755 A2 describe que niveles elevados de creatinina o urea en el suero sanguíneo son una indicación de un fracaso de un trasplante de riñón.
- 25 Malyszko *et al.* describen en una publicación que el nivel de creatinina sérica sigue siendo el "patrón de oro" en la evaluación de la función renal, aunque presenta importantes desventajas (Malyszko, Jolanta, *et al.* "Biomarkers of delayed graft function as a form of acute kidney injury in kidney transplantation". Scientific Reports 5 (2015): 11684).
- Suhre, K. *et al.* (2016) "Urine metabolite profiles predictive of human kidney allograft status", Journal of the American Society of Nephrology, 27(2), 626-636, describe metabolitos en orina indicativos del riesgo de rechazo de un trasplante de riñón.
- 30 El documento US 2008/0161228 A1 describe métodos para identificar rutas bioquímicas. Esta solicitud de patente enumera una gran cantidad de moléculas pequeñas que pueden encontrarse en la orina de un sujeto.
- 35 Un objeto de la presente invención es proporcionar sustancias marcadoras adicionales y combinaciones de marcadores apropiadas adecuadas para determinar el riesgo de rechazo de riñón y mejorar el rendimiento general de un método de análisis correspondiente.
- 40 Este objetivo se consigue mediante el uso de un nuevo conjunto de marcadores como se define en la reivindicación 1, es decir, en un método *in vitro* para determinar (predecir) el riesgo de rechazo de riñón de un individuo después de haber recibido una donación de riñón. Esta determinación se realiza mediante análisis de orina. Mientras que según las técnicas anteriores se utilizan generalmente sustancias individuales como marcador, los inventores descubrieron que sólo se puede conseguir una precisión suficientemente alta de un método de análisis correspondiente si se usan al menos tres sustancias como marcadores. Por tanto, el uso reivindicado en la presente de un conjunto de marcadores requiere la presencia de al menos tres sustancias que deben incluirse en el conjunto de marcadores. Estas sustancias deben seleccionarse del grupo formado por 3-hidroxi isovalerato, acetil carnitina, alanina, citrato, dimetilamina, glucosa, glucuronato, hipurato, lactato, malonato, metil guanidina, malonato de metilo, succinato de metilo, p-cresol, acetato de fenilo, fenilacetilglicina, fenilacetilglutamina, taurina, trigonelina y urea.
- 45 Algunas de estas sustancias ya se conocen como marcadores adecuados para determinar el riesgo de rechazo de riñón tras un trasplante de riñón en el documento WO 2012/045773 A9, a saber, 3-hidroxi isovalerato, acetil carnitina, citrato, glucosa, hipurato, lactato, malonato, metil guanidina, malonato de metilo, succinato de metilo, p-cresol, acetato de fenilo, fenilacetilglicina, taurina y trigonelina. Los inventores descubrieron sorprendentemente que la precisión de un método de análisis correspondiente se puede mejorar si hay necesariamente presente alanina en el conjunto de marcadores. Por consiguiente, el conjunto de marcadores, cuyo uso se reivindica en la presente, comprende necesariamente alanina. Se hará referencia también en lo sucesivo a la alanina, dimetilamina, glucuronato, fenilacetilglutamina y urea como sustancias marcadoras recientemente identificadas. El mayor rendimiento y, por tanto, la mejor idoneidad del conjunto de marcadores que comprende al menos una de estas sustancias marcadoras recientemente identificadas, en particular, la alanina, se explicará con más detalle con respecto a las realizaciones de ejemplo.
- 50 Es posible que sólo la alanina, es decir, una de las sustancias marcadoras recientemente identificadas esté presente en el conjunto de marcadores. También es posible que dos, tres, cuatro, cinco o seis sustancias marcadoras recientemente identificadas estén presentes en el conjunto de marcadores, en donde la alanina siempre está presente. También es posible que el conjunto de marcadores comprenda exclusivamente sustancias marcadoras recientemente identificadas, en donde el conjunto de marcadores comprende siempre alanina.
- 55
- 60
- 65

Las sustancias individuales que se encuentran en el conjunto de marcadores se utilizan de tal manera que se determina la concentración de estas sustancias en una muestra. A continuación, la concentración de la sustancia se puede utilizar para calcular una puntuación. La puntuación es indicativa del riesgo de rechazo de riñón de un individuo que previamente se sometió a un trasplante de riñón, es decir, quién recibió previamente una donación de riñón.

5 En una realización, es posible definir ciertos grupos de riesgo de rechazo de un riñón tras un trasplante de riñón. Por tanto, es posible definir un grupo de alto riesgo, un grupo de riesgo intermedio, un grupo de bajo riesgo y un grupo de muy bajo riesgo para clasificar de forma fácilmente accesible el riesgo determinado o previsto de rechazo de riñón. También es posible utilizar sólo algunos de estos grupos (p. ej., riesgo elevado, riesgo intermedio, riesgo bajo; o riesgo elevado, riesgo bajo, riesgo muy bajo) o definir grupos adicionales.

10 Al definir estos grupos (en particular basándose en el conjunto de datos de entrenamiento) para un modelo específico que utiliza determinadas sustancias marcadoras, es adecuado definir el grupo de alto riesgo de manera que al menos el 40 %, en particular, al menos el 45 %, en particular, al menos el 50 % de las muestras asignadas a este grupo sean muestras de individuos que mostraron rechazo de riñón. En una realización, el grupo de riesgo intermedio se define de manera que del 8 al 20 %, en particular, del 10 al 17 %, en particular, del 11 al 15 % de todas las muestras asignadas a este grupo son muestras de individuos que experimentaron un rechazo de riñón. En una realización, el grupo de bajo riesgo se define de manera que del 2 al 5 %, en particular, del 2,5 al 4,5, en particular, del 3 al 4 % de todas las muestras asignadas a este grupo son muestras de individuos que experimentaron un rechazo de riñón. En una realización, el grupo de riesgo muy bajo se define de modo que no más del 1,5 %, en particular, no más del 1 %, en particular, no más del 0,5 % de todas las muestras asignadas a este grupo son muestras de individuos que experimentaron un rechazo de riñón. Mediante tal agrupación, se puede asignar fácilmente una puntuación calculada a uno de estos grupos para que la relevancia médica de la puntuación calculada sea fácilmente accesible.

15 En una realización, el conjunto de marcadores comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 sustancias individuales. Como ya se ha explicado, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustancias del grupo formado por alanina, dimetilamina, glucuronato, fenilacetilglutamina y urea pueden estar presentes en el conjunto de marcadores, en donde la alanina está necesariamente presente en el conjunto de marcadores.

20 En una realización, el conjunto de marcadores comprende necesariamente al menos una sustancia seleccionada del subgrupo de sustancias marcadoras recientemente identificadas que consisten en dimetilamina, glucuronato y urea. Además de la alanina, se ha demostrado que estas sustancias marcadoras recientemente identificadas son especialmente adecuadas para mejorar el rendimiento general del conjunto de marcadores para determinar el riesgo de rechazo de riñón.

25 En otra realización, el conjunto de marcadores necesariamente comprende urea. La urea resultó ser una de las sustancias más adecuadas para aumentar el rendimiento general del conjunto de marcadores.

30 En una realización adicional, el conjunto de marcadores comprende necesariamente urea y alanina. En una realización adicional, el conjunto de marcadores necesariamente comprende urea, alanina y glucuronato. En una realización adicional, el conjunto de marcadores comprende necesariamente urea, alanina y dimetilamina.

En una realización, el conjunto de marcadores comprende lactato y citrato como sustancias marcadoras adecuadas ya conocidas en combinación con alanina.

35 En una realización, el conjunto de marcadores no contiene dimetilamina, lactato, acetato y alanina al mismo tiempo.

En una realización, el conjunto de marcadores no contiene solo dimetilamina, lactato y alanina.

En una realización, el conjunto de marcadores no contiene solo dimetilamina, acetato y alanina.

40 En una realización, el conjunto de marcadores no comprende solo lactato, acetato y alanina.

Los siguientes ejemplos de conjuntos de marcadores son conjuntos de marcadores especialmente adecuados:

- 45
- Lactato, citrato, urea y alanina.
 - Lactato, citrato, urea, alanina y glucuronato.
 - Lactato, citrato, urea, alanina y dimetilamina.

50 La presente invención se refiere también en un aspecto al uso del mismo conjunto de marcadores para el diagnóstico *in vivo* del riesgo de rechazo de riñón de un individuo después de haber recibido un riñón trasplantado. Por tanto, en este aspecto, la invención se refiere a un conjunto de marcadores que comprende al menos tres sustancias seleccionadas del grupo formado por 3-hidroxi isovalerato, acetil carnitina, alanina, citrato, dimetilamina, glucosa, glucuronato, hipurato, lactato, malonato, metil guanidina, malonato de metilo, succinato de metilo, p-cresol, acetato de fenilo, fenilacetilglicina, fenilacetilglutamina, taurina, trigonelina y urea, para su uso en el diagnóstico *in vivo* mediante análisis de orina del riesgo de rechazo de riñón de un individuo después de haber recibido una donación de riñón, con la condición de que el conjunto de marcadores comprenda alanina.

55

60

65

Realizaciones del uso *in vitro* del conjunto de marcadores explicado anteriormente también son aplicables a un uso *in vivo* o al uso diagnóstico del conjunto de marcadores en cualquier combinación deseada.

- 5 El uso reivindicado del conjunto de marcadores en el diagnóstico *in vivo* constituye otra indicación médica de este conjunto de marcadores. De este modo, la alanina siempre está presente en el conjunto de marcadores.

En un aspecto, la invención también se refiere a un método para analizar una muestra de orina aislada *in vitro*. Este método comprende las etapas que se explican a continuación y utiliza una muestra de orina de un individuo que ha recibido una donación de riñón. Esta muestra de orina se puede tomar en cualquier momento después del trasplante de riñón, p. ej., de 0 días a 400 días después del trasplante, en particular, de 1 día a 365 días después del trasplante, en particular, de 2 días a 350 días después del trasplante, en particular, de 3 días a 340 días después del trasplante, en particular, de 4 días a 330 días después del trasplante, en particular, de 5 días a 320 días después del trasplante, en particular, de 6 días a 310 días después del trasplante, en particular, de 7 días a 300 días después del trasplante, en particular, de 8 días a 290 días después del trasplante, en particular, de 10 días a 280 días después del trasplante, en particular, de 11 días a 270 días después del trasplante, en particular, de 12 días a 260 días después del trasplante, en particular, de 13 días a 250 días después del trasplante, en particular, de 14 días a 240 días después del trasplante, en particular, de 15 días a 230 días después del trasplante, en particular, de 16 días a 220 días después del trasplante, en particular, de 17 días a 210 días después del trasplante, en particular, de 18 días a 200 días después del trasplante, en particular, de 19 días a 190 días después del trasplante, en particular, de 20 días a 180 días después del trasplante, en particular, de 25 días a 170 días después del trasplante, en particular, de 30 días a 160 días después del trasplante, en particular, de 40 días a 150 días después del trasplante, en particular, de 50 días a 140 días después del trasplante, en particular, de 60 días a 130 días después del trasplante, en particular, de 70 días a 120 días después del trasplante, en particular, de 80 días a 110 días después del trasplante, en particular, de 90 a 100 días después del trasplante. De este modo, "0 días" significa menos de 24 horas después del trasplante de riñón.

La concentración de al menos tres sustancias seleccionadas del grupo formado por 3-hidroxi isovalerato, acetil carnitina, alanina, citrato, dimetilamina, glucosa, glucuronato, hipurato, lactato, malonato, metil guanidina, malonato de metilo, succinato de metilo, p-cresol, acetato de fenilo, fenilacetilglicina, fenilacetilglutamina, taurina, trigonelina y urea, se determina con una técnica de medición adecuada. Estas sustancias sirven como sustancias marcadoras. De este modo, la concentración de alanina está necesariamente determinada.

Una técnica de medición muy adecuada para determinar la concentración de sustancias individuales es la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (espectroscopia de RMN).

Las concentraciones determinadas se utilizan posteriormente para calcular una puntuación. De este modo, la puntuación es indicativa del riesgo de rechazo de riñón del individuo.

Generalmente es posible calcular la puntuación de cualquier forma deseada. Una forma adecuada de calcular la puntuación se divulga en las páginas 25 a 27 del documento WO 2012/045773 A9. Otra forma adecuada de calcular la puntuación es la siguiente:

$$puntuación = \frac{1}{1+e^{-\omega}}$$

45 en donde

$$\omega = a + \sum_{x=1}^n b_x \cdot I_x$$

- 50 $a = const.$
 $b_x = coeficiente\ específico\ de\ la\ sustancia$
 $I = parámetro\ que\ es\ indicativo\ de\ la\ concentración\ de\ la\ sustancia\ x$

De este modo, los factores individuales a, b deben ajustarse según el modelo subyacente y pueden variar dependiendo de las sustancias específicas consideradas en el conjunto de marcadores. El parámetro "I" puede ser, p. ej., la intensidad de la señal correspondiente observada en el resultado de medición evaluado. Para dar un ejemplo, "I" puede ser la intensidad de señal de una señal de RMN en un espectro de RMN si se utiliza espectroscopia de RMN como técnica de medición.

En una realización, la puntuación calculada se genera y se presenta al individuo y/o a una tercera persona, como un médico o personal médico. El resultado se puede producir en una pantalla (es decir, de forma electrónica) o en forma impresa. De este modo, también es posible generar un informe indicando la puntuación, opcionalmente en combinación con una escala comparativa de posibles puntuaciones y su significado con respecto al riesgo de rechazo de riñón después del trasplante de riñón.

En una realización, la muestra se agrupa en uno de al menos dos grupos predefinidos basándose en la puntuación calculada. La agrupación correspondiente también se puede indicar en un informe correspondiente.

5 El uso de una muestra de orina es particularmente adecuado para llevar a cabo el método ya que las muestras de orina se pueden recolectar fácilmente de los individuos y no necesitan ninguna interacción más cercana con el cuerpo del individuo.

10 Para compensar las diferentes concentraciones generales de marcadores en diferentes muestras, las concentraciones determinadas son, en una realización, normalizadas a la concentración de creatinina determinada adicionalmente. Si una persona, de quien se ha obtenido la muestra de orina analizada, ha ingerido un gran volumen de líquido, su volumen total de orina también es grande. Al mismo tiempo, la concentración global de las sustancias marcadoras (y otras sustancias) en la orina es en tal caso generalmente menor que en una muestra tomada de una persona que ha ingerido un volumen menor de líquido y tiene un volumen total de orina menor. Si las concentraciones de marcador determinadas se dividen por la concentración de creatinina en la misma muestra de orina (es decir, normalizadas a la concentración de creatinina), estos efectos se borran.

20 La puntuación mencionada anteriormente puede constituir la base de una prueba de diagnóstico basada en al menos tres metabolitos.

25 En una realización, una puntuación ampliada se calcula a partir de la puntuación teniendo en cuenta además al menos un valor adicional. Esto puede aumentar aún más el rendimiento de una prueba de diagnóstico basada en el método descrito en la presente. Este valor adicional se selecciona del grupo que consiste en un valor que es indicativo de la concentración de creatinina en el suero sanguíneo del individuo, siendo un valor indicativo de la tasa de filtración glomerular (TFG) del individuo, y siendo un valor indicativo de la tasa de filtración glomerular estimada (TFGe) del individuo. De este modo, es particularmente adecuado calcular una puntuación ampliada considerando un valor indicativo de la concentración de creatinina en suero sanguíneo. Al hacerlo, se tienen en cuenta tanto la información relativa a la concentración de sustancias marcadoras individuales en la orina del individuo (paciente) como también la información relativa a la concentración de creatinina en el suero sanguíneo del individuo. Esto mejora adicionalmente la confiabilidad de todo el método con respecto a la exactitud de la puntuación extendida calculada.

35 La combinación de la puntuación basada en metabolitos e información adicional basada en la concentración de creatinina en suero sanguíneo, la TFG y/o la TFGe dan como resultado un sistema de apoyo a la decisión. Un sistema de apoyo a la decisión de este tipo es particularmente adecuado para agrupar diferentes muestras en diferentes grupos (como diferentes grupos de riesgo para una enfermedad específica o indicación como el riesgo de rechazo de riñón después del trasplante de riñón de un individuo que ha recibido una donación de riñón). A partir de tal agrupación, se puede ayudar a un médico a evaluar la relevancia médica del resultado obtenido o a realizar un diagnóstico.

40 El método *in vitro* descrito también puede considerarse como un método para proporcionar datos originales que luego pueden ser utilizados por un médico para hacer un diagnóstico sobre el riesgo de rechazo del riñón después del trasplante de riñón. Esta etapa de diagnóstico no forma parte del método reivindicado.

Adjunto se divulga un sistema de apoyo a la decisión que implementa un método como se explicó anteriormente.

45 Por la presente se describe el uso de la concentración de creatinina en una muestra de orina para normalizar la concentración de al menos otra sustancia determinada en la misma muestra de orina, en particular, dividiendo la concentración de la otra sustancia por la concentración de creatinina. Este método de normalización puede, en una realización, combinarse con cualquier otro método o uso descrito o reivindicado en el presente documento.

50 Todas las realizaciones explicadas de los usos descritos se pueden aplicar en cualquier combinación deseada a los métodos descritos y viceversa.

55 A continuación, se explicarán aspectos de la invención con más detalle con respecto a realizaciones de ejemplo y las figuras adjuntas. En las figuras:

la Figura 1A muestra un gráfico de las características operativas del receptor (ROC) de sensibilidad frente a especificidad de un modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón teniendo en cuenta el lactato, citrato y trigonelina como sustancias marcadoras (ejemplo comparativo);

60 la Figura 1B muestra un gráfico ROC de sensibilidad frente a especificidad de un modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón teniendo en cuenta el lactato, citrato e hipurato como sustancias marcadoras (ejemplo comparativo);

65 la Figura 1C muestra un gráfico ROC de sensibilidad frente a especificidad de un modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón teniendo en cuenta el lactato, citrato y urea como sustancias marcadoras;

- la Figura 2A muestra un gráfico ROC de sensibilidad frente a especificidad de un modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón teniendo en cuenta el lactato, citrato, trigonelina y glucosa como sustancias marcadoras (ejemplo comparativo);
- 5 la Figura 2B muestra un gráfico ROC de sensibilidad frente a especificidad de un modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón teniendo en cuenta el lactato, citrato, hipurato y glucosa como sustancias marcadoras (ejemplo comparativo);
- 10 la Figura 2C muestra un gráfico ROC de sensibilidad frente a especificidad de un modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón teniendo en cuenta el lactato, citrato, trigonelina e hipurato como sustancias marcadoras (ejemplo comparativo);
- la Figura 2D muestra un gráfico ROC de sensibilidad frente a especificidad de un modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón teniendo en cuenta el lactato, citrato, urea y alanina como sustancias marcadoras;
- 15 la Figura 2E muestra un gráfico ROC de sensibilidad frente a especificidad de un modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón teniendo en cuenta el lactato, citrato, urea y glucuronato como sustancias marcadoras;
- 20 la Figura 2F muestra un gráfico ROC de sensibilidad frente a especificidad de un modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón teniendo en cuenta el lactato, citrato, urea y alanina como sustancias marcadoras y además teniendo en cuenta la concentración de creatinina en el suero sanguíneo del individuo;
- la Figura 2G muestra un gráfico ROC de sensibilidad frente a especificidad de un modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón teniendo en cuenta el lactato, citrato, urea y alanina como sustancias marcadoras y además considerando la tasa de filtración glomerular estimada del individuo;
- 25 la Figura 3A muestra un gráfico ROC de sensibilidad frente a especificidad de un modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón teniendo en cuenta el lactato, citrato, trigonelina, hipurato y glucosa como sustancias marcadoras (ejemplo comparativo);
- 30 la Figura 3B muestra un gráfico ROC de sensibilidad frente a especificidad de un modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón teniendo en cuenta el lactato, citrato, urea, alanina y glucuronato como sustancias marcadoras; y
- 35 la Figura 3C muestra un gráfico ROC de sensibilidad frente a especificidad de un modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón teniendo en cuenta el lactato, citrato, urea, alanina y dimetilamina como sustancias marcadoras.
- 40 Los resultados representados en las Figuras 1A a 3C se basan en un análisis de más de 4200 muestras de orina de pacientes que obtuvieron una donación de riñón. Las muestras de orina se tomaron de estos pacientes en un período de tiempo entre 14 días después del trasplante y 365 días después del trasplante. De este modo, en una primera etapa se analizó un conjunto de muestras de entrenamiento (basado en más de 870 muestras) para identificar sustancias marcadoras adecuadas. Seguidamente, las sustancias marcadoras adecuadas identificadas se han probado en un conjunto de muestras de validación (más de 580 muestras) para evaluar el rendimiento de una determinación del riesgo de rechazo de riñón utilizando estas sustancias marcadoras.
- 45

Manejo y preparación de muestras

- 50 Se recogieron muestras de orina de mitad de flujo en vasos de plástico convencionales para orina y se transfirieron alícuotas de 1 ml a tubos de muestra de 1,5 ml. Las alícuotas se congelaron a -20 °C dentro de las 8 horas posteriores a la recolección. Con fines de almacenamiento, los tubos se mantuvieron a -80 °C. Para mediciones de RMN, se dejaron descongelar alícuotas a temperatura ambiente. Al descongelarse por completo, se mezclaron 600 µl de la alícuota con 120 µl de solución de aditivo urinario Axinon®. La mezcla se centrifugó a 20.000 g durante 10 minutos y
- 55 se transfirieron 600 µl del sobrenadante a tubos de RMN de 5 mm y se mantuvieron a 4-8 °C hasta la medición.

Mediciones de RMN

- 60 Todas las mediciones se llevaron a cabo en un espectrómetro de RMN Bruker Avance II+ de 600 MHz utilizando una sonda PATXI 1 H/D-13C/15N Z-GRD. Todas las muestras se mantuvieron a 5-7 °C en el SampleJet y se llevaron a la temperatura objetivo en el bloque de precalentamiento integrado antes de la medición. Se utilizó un programa de pulso convencional con pulso de excitación de 30 grados y presaturación para la supresión de agua (zgpr30).

- 65 Las muestras se midieron en lotes de hasta 93 muestras por ejecución. Además de las muestras mencionadas anteriormente, cada ejecución incluyó una muestra de calibrador de orina Axinon® y dos muestras de control de orina Axinon® (antes y después de las muestras analíticas de orina, respectivamente) para asegurar condiciones de medición ideales durante toda la ejecución.

Análisis de señales

5 Los espectros de RMN se sometieron a referencia automática, corrección de fase y corrección de línea de base antes de un análisis adicional.

10 Seguidamente, los espectros de RMN se sometieron a un procedimiento automático de estandarización y calibración para minimizar los efectos entre dispositivos, entre días y entre ejecuciones. La calidad de cada uno de estos espectros fue evaluada mediante un algoritmo de calificación de espectro personalizado que analiza las propiedades espectrales generales, p. ej., desplazamiento e inclinación de la línea de base en regiones espectrales seleccionadas y propiedades de señales indicadoras seleccionadas, p. ej., posición de la señal, forma y anchura. Los espectros que no cumplieron con los criterios de calidad predefinidos se excluyeron de análisis posteriores. Los espectros calificados con éxito se dividieron en 403 recipientes de 0,04 ppm de anchura colocados con una superposición del 50 % entre recipientes consecutivos que cubrían un intervalo espectral de 0,96 a 9,04 ppm. En los análisis no se consideró el área de 4,5 a 5,0 ppm (señal de agua). Por tanto, quedaron un total de 377 recipientes para análisis posteriores.

15 La cuantificación de picos de señal específicos se realizó ajustando funciones Pseudo-Voigt, que representan una combinación lineal de una función gaussiana y lorentziana, a cada pico de interés. Se verificó la validez del ajuste de los ajustes de señal resultantes para rechazar resultados de calidad de ajuste insuficiente.

Identificación de sustancias marcadoras

25 Las sustancias marcadoras adecuadas se identificaron con la ayuda de los espectros de RMN obtenidos de forma iterativa combinando la información de RMN con la información adicional de si la muestra subyacente se tomó de un individuo que mostró rechazo de riñón o de un individuo que no mostró rechazo de riñón.

30 Un individuo que se recuperó bien del trasplante de riñón y no mostró ninguna anomalía significativa se consideró un individuo que no mostró rechazo de riñón. Los individuos que presentaban problemas renales después de un trasplante de riñón se sometieron a una biopsia, que era el patrón de oro para determinar si el riñón donado era rechazado o no. Si el resultado de dicha biopsia fue que se había producido o estaba a punto de producirse un rechazo de riñón, se consideró que estos individuos presentaban rechazo de riñón.

35 Dado que una biopsia puede causar hematuria y potencialmente afectar directamente a la función renal, en la evaluación se incluyeron sólo muestras de orina tomadas dentro del plazo máx. de 7 días antes de la biopsia. Por tanto, si se tomó una muestra de orina de un individuo que posteriormente se sometió a una biopsia que resultó en el hallazgo de que estaba a punto de ocurrir o ya se había producido un rechazo de riñón, la muestra fue asignada a un individuo que tenía un alto riesgo de rechazo de riñón. Si una biopsia no arrojó ningún resultado indicativo de rechazo de riñón, se consideró que el individuo correspondiente era una persona que no tenía riesgo significativo de rechazo de riñón.

Prueba de sustancias marcadoras identificadas

45 Las sustancias marcadoras identificadas se probaron en diferentes combinaciones para evaluar su idoneidad para determinar el riesgo de rechazo de riñón de un individuo después de un trasplante de riñón. Al hacerlo, el resultado de la determinación basada en las sustancias marcadoras (riesgo previsto) se ha comparado con los signos clínicos de rechazo de riñón y/o disfunción del trasplante, así como con los resultados de las biopsias realizadas (rechazo de riñón histológicamente comprobado).

50 Los resultados se resumen en gráficos de características operativas del receptor (ROC). En estos gráficos, el área bajo la curva (AUC) indica la idoneidad de la predicción. Si el AUC es 0,5, la predicción debe considerarse aleatoria y, por tanto, no adecuada. Cuanto mayor sea el AUC, mejor será el modelo de predicción.

55 La Figura 1A muestra un gráfico ROC de un modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón teniendo en cuenta el lactato, citrato y trigonelina como sustancias marcadoras (ejemplo comparativo). Estas sustancias ya se conocen por el estado de la técnica como sustancias para determinar el riesgo de rechazo de riñón, pero no se han descrito hasta ahora en esta combinación específica. Para compensar las diferencias de concentración, todas las concentraciones de sustancias determinadas en este ejemplo y en los siguientes se han normalizado a la concentración de creatinina en la orina. Por tanto, la concentración de creatinina en la orina sirve como patrón interno. El AUC resultante es 0,714. Este AUC es mucho mejor que una simple predicción aleatoria y también mejor que el AUC correspondiente de una sustancia individual utilizada como marcador para determinar el riesgo de rechazo de riñón. No obstante, se desea una mejora adicional de la fiabilidad del modelo de predicción.

65 Si la trigonelina se reemplaza por hipurato, el AUC es 0,706 y, por lo tanto, aún más bajo (ejemplo comparativo), como se puede observar en la Figura 1B. También se conoce por el estado de la técnica el uso del hipurato como marcador para determinar el riesgo de rechazo de riñón.

Si, sin embargo, la trigonelina se reemplaza por una sustancia marcadora recientemente identificada, concretamente, urea, el AUC aumenta significativamente a 0,741. Esto se muestra en la Figura 1C. Por tanto, una combinación de dos sustancias marcadoras "antiguas" (lactato y citrato) con una sustancia marcadora recientemente identificada (urea) da como resultado un rendimiento mucho mayor del modelo de predicción respectivo.

Generalmente, la calidad del modelo de predicción se puede aumentar aumentando el número total de sustancias marcadoras incluidas en el modelo de predicción. La Figura 2A muestra un gráfico ROC del modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón teniendo en cuenta el lactato, citrato, trigonelina y glucosa (ejemplo comparativo). Utilizando estas cuatro sustancias ya conocidas como sustancias marcadoras, se obtiene un AUC de 0,732.

Al usar hipurato en lugar de trigonelina, el AUC cae a 0,717, como se muestra en la Figura 2B (ejemplo comparativo).

Cuando se usa una combinación de lactato, citrato, trigonelina e hipurato como sustancias marcadoras en un modelo para determinar el riesgo de rechazo de riñón, se obtiene un AUC de 0,716, como se muestra en la Figura 2C (ejemplo comparativo).

Por tanto, un modelo que utiliza cuatro sustancias marcadoras ya conocidas da como resultado un AUC que oscila entre 0,716 y 0,732.

El rendimiento de un modelo acorde para predecir el riesgo de rechazo de riñón se puede aumentar significativamente al incluir en el modelo dos sustancias marcadoras recientemente identificadas. Si el modelo se basa en lactato, citrato, urea y alanina, se obtiene un AUC de 0,752, tal como se muestra en la Figura 2D.

Se puede observar un AUC alto similar para un modelo que tiene en cuenta el lactato, citrato, urea y glucuronato. Esto se muestra en la Figura 2E, que indica un AUC de 0,748.

La calidad de predicción de un modelo acorde para determinar el riesgo de rechazo de riñón después del trasplante de riñón puede aumentar aún más si se incluye información adicional del paciente en el modelo. La Figura 2F muestra un gráfico ROC de un modelo que tiene en cuenta el lactato, citrato, urea y alanina como sustancias marcadoras (como el modelo subyacente en la Figura 2D). Al considerar además la concentración de creatinina en el suero sanguíneo del mismo individuo, el AUC se puede aumentar de 0,752 (véase la Figura 2D) a 0,830, tal como se muestra en la Figura 2F. De este modo, la puntuación calculada para el riesgo previsto de rechazo de riñón se ha multiplicado por la concentración de creatinina en el suero sanguíneo del mismo individuo, de quien se ha analizado una muestra de orina.

Se puede observar un aumento de rendimiento igualmente alto cuando se combina un modelo de predicción con información adicional basada en la tasa de filtración glomerular estimada (eGFR). La Figura 2G muestra el rendimiento de un modelo teniendo en cuenta el lactato, citrato, urea y alanina como sustancias marcadoras (véase la Figura 2D) y, además, considerando la tasa de filtración glomerular estimada como parámetro adicional. Al hacerlo, el AUC aumenta de 0,752 (véase la Figura 2D) a 0,836, como se indica en la Figura 2G. De este modo, la puntuación para predecir el riesgo de rechazo de riñón calculada basándose en el lactato, citrato, urea y alanina se han dividido por la tasa de filtración glomerular estimada determinada del mismo individuo, de quien se ha analizado una muestra de orina.

Si en un conjunto de marcadores de un modelo para predecir el riesgo de rechazo de riñón tras un trasplante de riñón se utilizan cinco en lugar de cuatro sustancias marcadoras ya conocidas, las AUC difícilmente pueden aumentarse. Esto se muestra en la Figura 3A que representa un gráfico ROC de un modelo que tiene en cuenta el lactato, citrato, trigonelina, hipurato y glucosa como sustancias marcadoras (ejemplo comparativo). El AUC resultante es 0,733 y, por tanto, sólo ligeramente superior al AUC de un modelo que tiene en cuenta el lactato, citrato, trigonelina y glucosa como sustancias marcadoras (véase la Figura 2A).

Si, sin embargo, dos sustancias marcadoras ya conocidas (lactato y citrato) se combinan con tres sustancias recientemente identificadas, la calidad de predicción del modelo se puede aumentar significativamente, como lo indica un AUC significativamente mayor. Específicamente, si se utiliza un modelo para predecir el riesgo de rechazo de riñón después de un trasplante de riñón que tenga en cuenta el lactato, citrato, urea, alanina y glucuronato como sustancias marcadoras, se obtiene un AUC de 0,756, como se indica en la Figura 3B.

Si el glucuronato se reemplaza por dimetilamina, el AUC resultante es 0,749 y, por tanto, ligeramente inferior, pero sigue siendo mucho mayor que sin estas sustancias marcadoras recientemente identificadas. En la Figura 3C se muestra un gráfico ROC correspondiente.

Resumiendo, las sustancias marcadoras recientemente identificadas alanina, dimetilamina, glucuronato, fenilacetilglutamina y urea aumentan considerablemente la fiabilidad y el rendimiento de los modelos de predicción para evaluar el riesgo de rechazo de riñón después del trasplante de riñón si se utilizan solas o en combinación con sustancias marcadoras ya conocidas para este propósito. Por tanto, mediante el uso (adicional) de estas sustancias

marcadoras, los métodos para determinar o predecir el riesgo de rechazo de riñón después de un trasplante de riñón se pueden realizar con mucha mayor precisión y confiabilidad. Esto también se aplica a los métodos que proporcionan datos originales que posteriormente pueden ser utilizados por un médico para realizar un diagnóstico sobre el riesgo de rechazo de riñón.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un conjunto de marcadores que comprende al menos tres sustancias seleccionadas del grupo formado por 3-hidroxi isovalerato, acetil carnitina, alanina, citrato, dimetilamina, glucosa, glucuronato, hipurato, lactato, malonato, metil guanidina, malonato de metilo, succinato de metilo, p-cresol, acetato de fenilo, fenilacetilglicina, fenilacetilglutamina, taurina, trigonelina y urea, en un método *in vitro* para determinar el riesgo de rechazo de riñón de un individuo después de haber obtenido una donación de riñón mediante análisis de orina, con la condición de que el conjunto de marcadores comprenda alanina.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el conjunto de marcadores comprende al menos una sustancia seleccionada del grupo formado por dimetilamina, glucuronato y urea.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el conjunto de marcadores comprende urea.
4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el conjunto de marcadores comprende lactato y citrato.
5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el conjunto de marcadores no contiene dimetilamina, lactato, acetato y alanina al mismo tiempo.
6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el conjunto de marcadores no contiene solo dimetilamina, lactato y alanina.
7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el conjunto de marcadores no contiene solo dimetilamina, acetato y alanina.
8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el conjunto de marcadores no comprende solo lactato, acetato y alanina.
9. Conjunto de marcadores que comprende al menos tres sustancias seleccionadas del grupo formado por 3-hidroxi isovalerato, acetil carnitina, alanina, citrato, dimetilamina, glucosa, glucuronato, hipurato, lactato, malonato, metil guanidina, malonato de metilo, succinato de metilo, p-cresol, acetato de fenilo, fenilacetilglicina, fenilacetilglutamina, taurina, trigonelina y urea, para su uso en el diagnóstico *in vivo* del riesgo de rechazo de riñón de un individuo después de haber recibido una donación de riñón mediante análisis de orina, con la condición de que el conjunto de marcadores comprenda alanina.
10. Método para analizar una muestra de orina aislada *in vitro*, que comprende las siguientes etapas:
- determinar la concentración de al menos tres sustancias seleccionadas del grupo formado por 3-hidroxi isovalerato, acetil carnitina, alanina, citrato, dimetilamina, glucosa, glucuronato, hipurato, lactato, malonato, metil guanidina, malonato de metilo, succinato de metilo, p-cresol, acetato de fenilo, fenilacetilglicina, fenilacetilglutamina, taurina, trigonelina y urea en una muestra de orina de un individuo que ha recibido una donación de riñón analizando la muestra de orina con una técnica de medición adecuada, con la condición de que se determine la concentración de alanina, y
 - calcular una puntuación a partir de las concentraciones determinadas, siendo la puntuación indicativa del riesgo de rechazo de riñón del individuo.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado por que** las concentraciones determinadas se normalizan a la concentración de creatinina en la misma muestra de orina.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, **caracterizado por que** la muestra de orina se agrupa en uno de al menos dos grupos predefinidos basándose en la puntuación calculada.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, **caracterizado por que** se calcula una puntuación ampliada a partir de la puntuación considerando además al menos un valor del grupo que consiste en un valor que es indicativo de la concentración de creatinina en el suero sanguíneo del individuo, siendo un valor indicativo de la tasa de filtración glomerular del individuo, y siendo un valor indicativo de la tasa de filtración glomerular estimada del individuo.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado por que** la muestra se agrupa en uno de al menos dos grupos predefinidos basándose en la puntuación ampliada calculada, proporcionando, por tanto, un sistema de apoyo a la decisión.

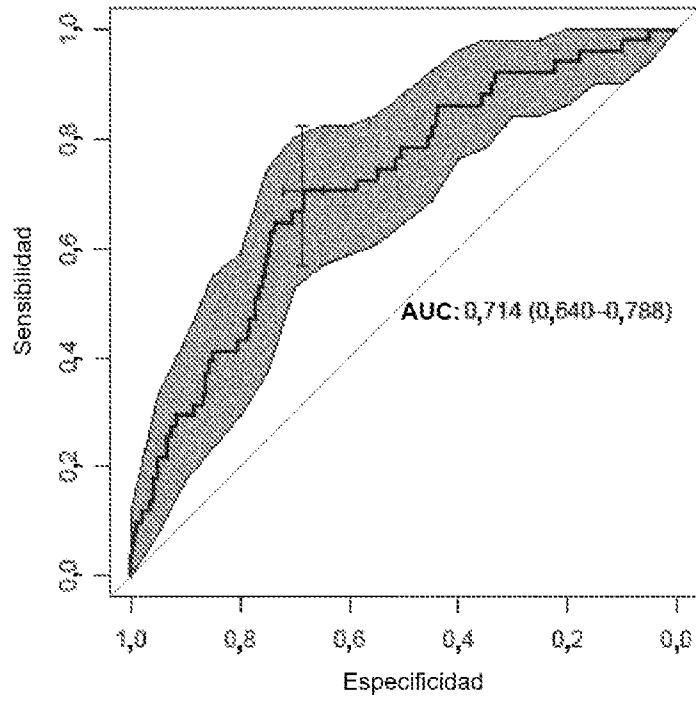


FIG 1A

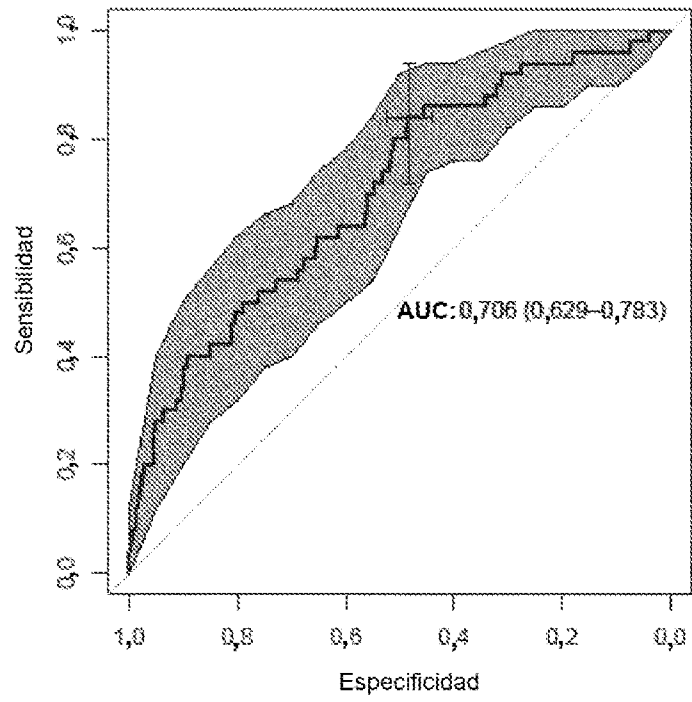


FIG 1B

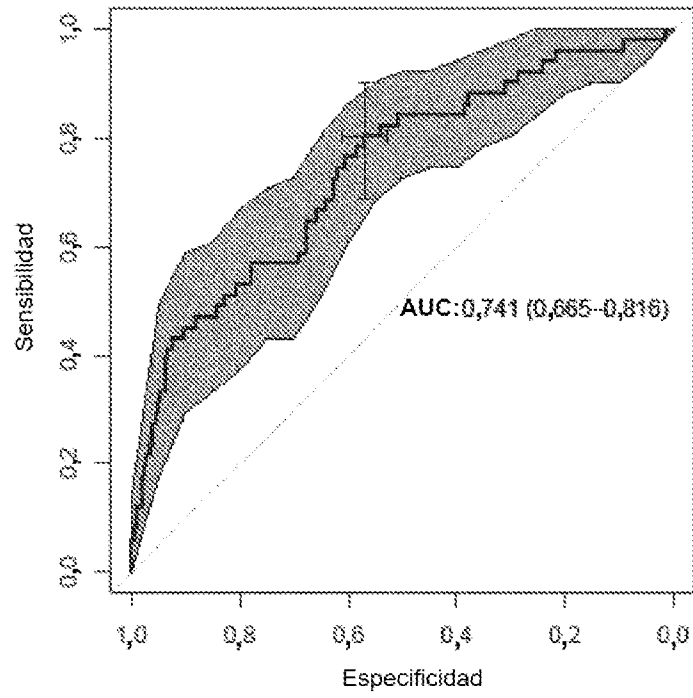


FIG 1C

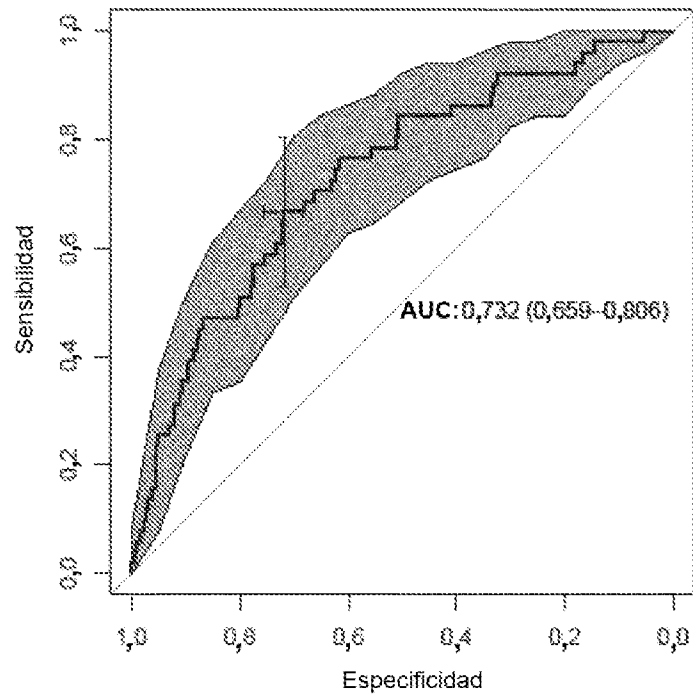


FIG 2A

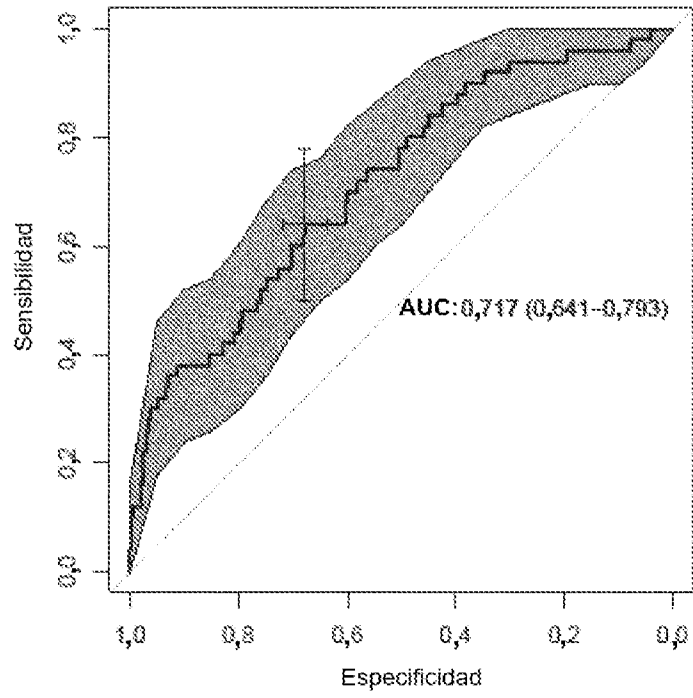


FIG 2B

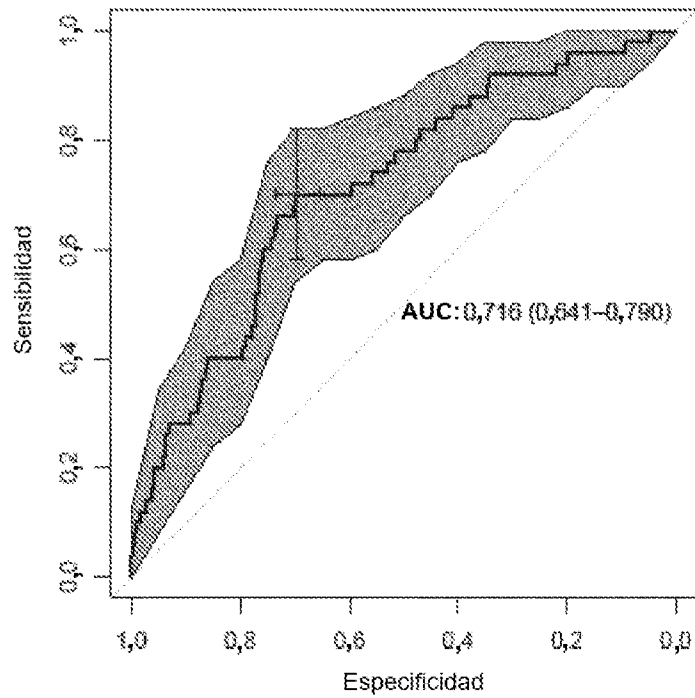


FIG 2C

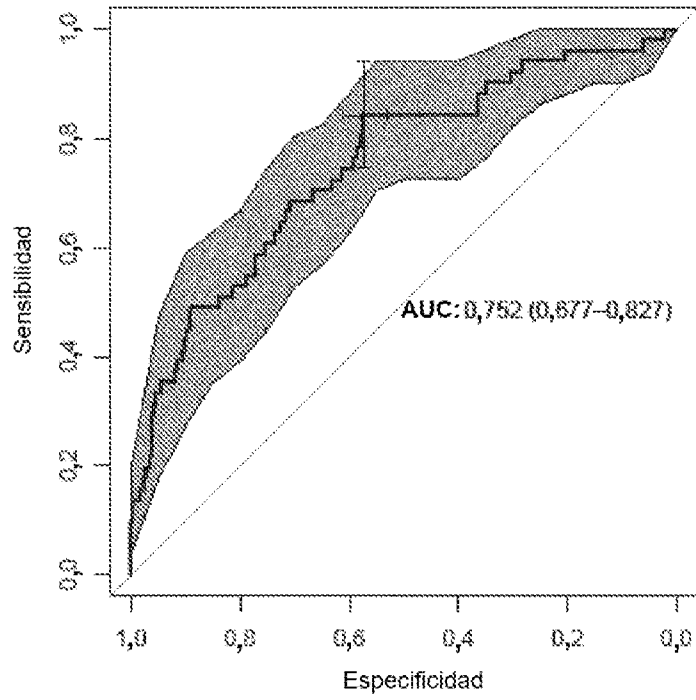


FIG 2D

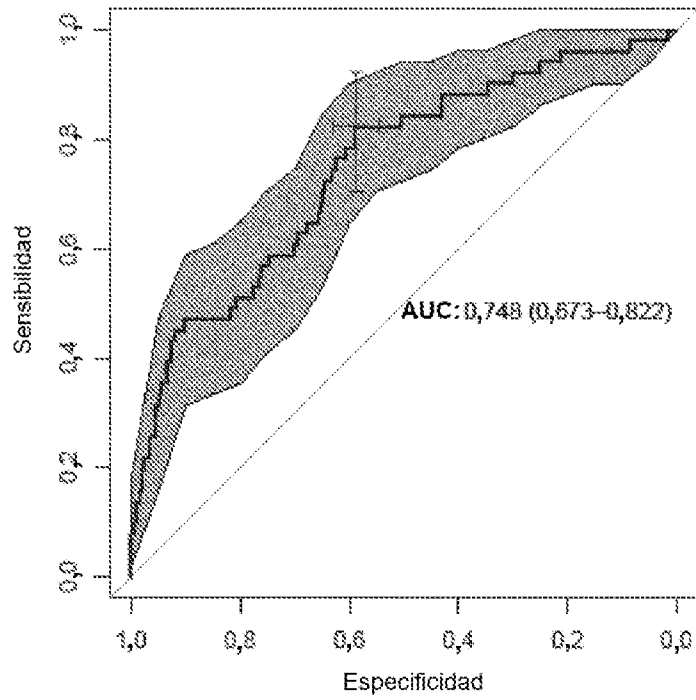


FIG 2E

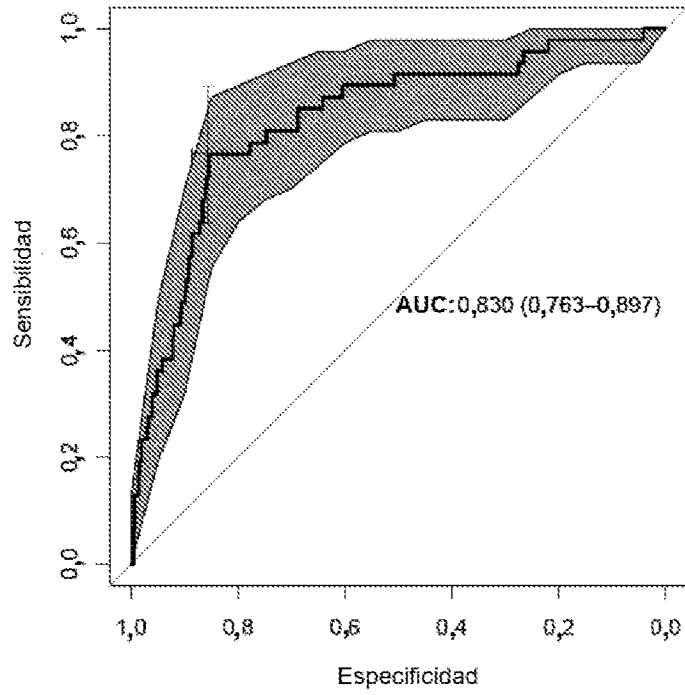


FIG 2F

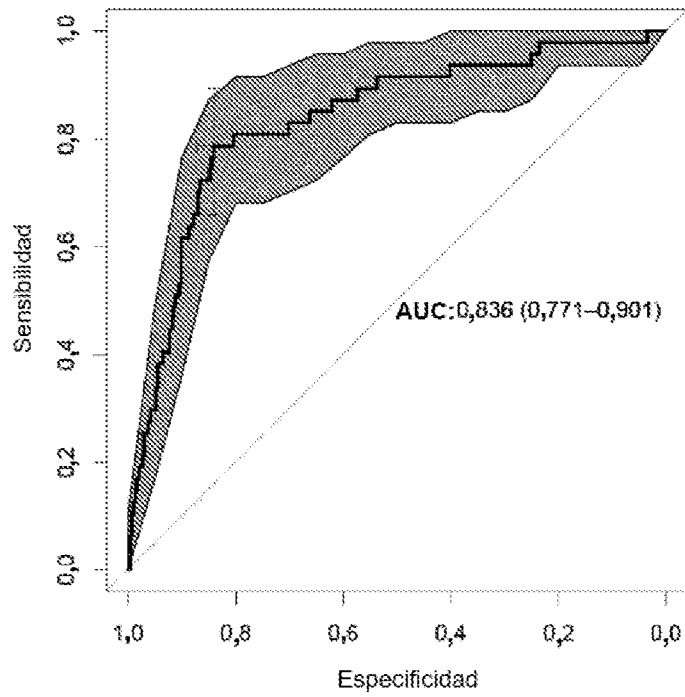


FIG 2G

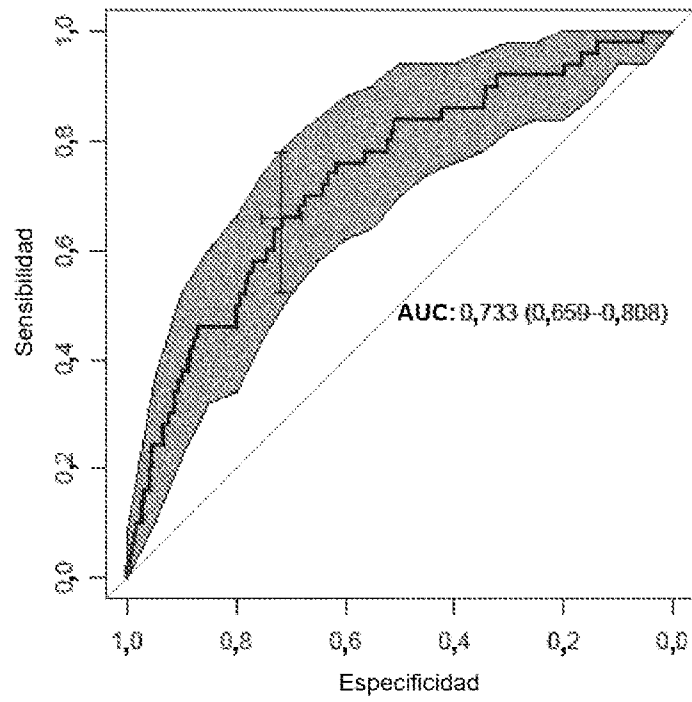


FIG 3A

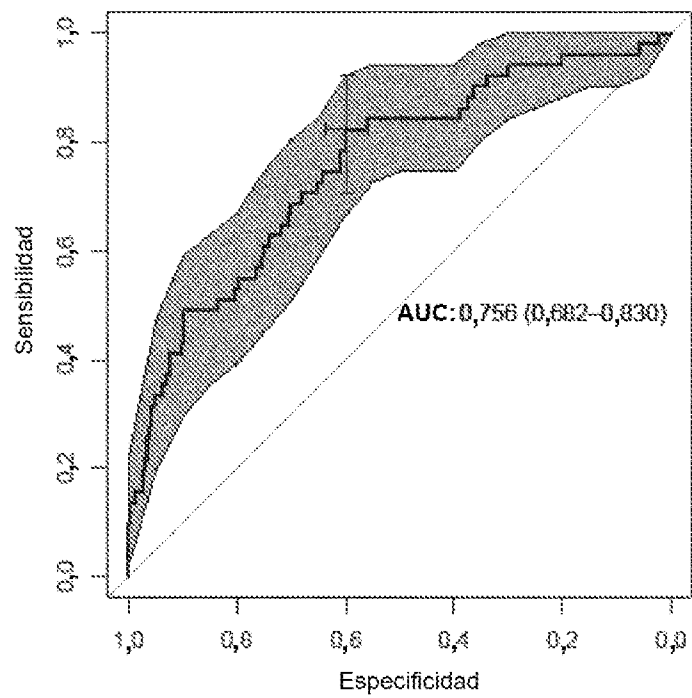


FIG 3B

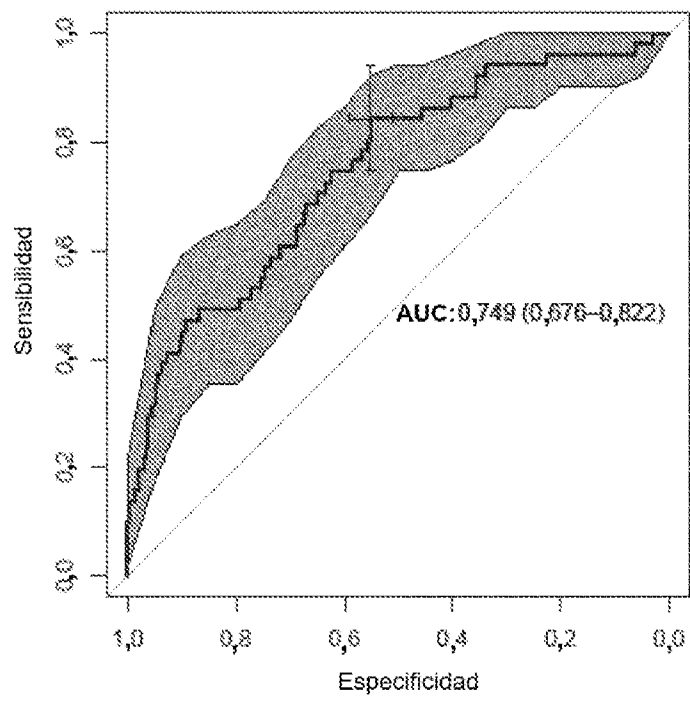


FIG 3C