

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 824 108**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2015 PCT/US2015/020291**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15138803**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2015 E 15761612 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 3117220**

54 Título: **Método para identificar receptores de aloinjertos de riñón en riesgo de lesión crónica**

30 Prioridad:

12.03.2014 US 201461951651 P

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

11.05.2021

73 Titular/es:

**ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI
(50.0%)**

**One Gustave L. Levy Place, P.O. Box 1030
New York, NY 10029, US y**

**WESTERN SYDNEY LOCAL HEALTH DISTRICT
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**MURPHY, BARBARA;
ZHANG, WEIJIA y
O'CONNELL, PHILIP J.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 824 108 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

Método para identificar receptores de aloinjertos de riñón en riesgo de lesión crónica

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para identificar receptores de aloinjertos de riñón con riesgo de lesión crónica y a un kit para usar en la invención. Los métodos comprenden analizar las firmas del transcriptoma obtenidas de biopsias tempranas de aloinjertos de riñón que funcionan de manera estable con el fin de identificar y tratar a dichos pacientes.

Antecedentes de la invención

El trasplante de riñón es el trasplante de órganos sólidos más común que se realiza en Estados Unidos; en 2010 se realizaron más de 16.000 trasplantes (informe de datos de SRTR de 2011). A pesar de una incidencia reducida de rechazo agudo, no se han logrado mejoras en la supervivencia a largo plazo del aloinjerto (1-2).

El daño crónico del aloinjerto (DCA) o la fibrosis intersticial y la atrofia tubular (FI/AT) de causa desconocida es el principal factor determinante de la pérdida del injerto después del primer año de trasplante (3). Los eventos clínicos e histológicos asociados con FI/AT son poco predictivos de la pérdida del injerto (4), lo que dificulta la identificación de aloinjertos que pueden beneficiarse de intervenciones tempranas para prevenir la progresión de la fibrosis. Las biopsias de aloinjerto en respuesta a la disfunción renal siguen siendo el enfoque diagnóstico actual de la lesión crónica, en qué etapa se ha desarrollado la fibrosis irreversible. Existe evidencia sustancial de que los cambios patológicos en el aloinjerto renal son anteriores a los cambios funcionales (5). Las biopsias por protocolo han sugerido que más del cincuenta por ciento de los injertos con función renal estable tienen evidencia de FI/AT al año (6). El desarrollo de un ensayo predictivo para identificar los injertos en riesgo temprano después del trasplante es esencial para diseñar intervenciones terapéuticas dirigidas. Los presentes inventores han aprendido que los cambios moleculares obtenidos a partir de biopsias por protocolo realizadas poco después del trasplante son anteriores al desarrollo de la fibrosis. De acuerdo con la presente invención, se ha desarrollado un conjunto de genes predictivos que identifica aloinjertos en riesgo de lesión progresiva. Este hallazgo permite identificar a los receptores en riesgo de pérdida del injerto en un momento en que la intervención terapéutica puede prevenir la FI/AT.

Sumario de la invención

Se ha identificado un conjunto de 13 genes que predice de forma independiente el desarrollo de fibrosis al año y la pérdida temprana del injerto. La alta capacidad predictiva del conjunto de genes (AUC 0,947) fue superior a los indicadores clínicos (AUC 0,78). Los parámetros histológicos de rutina no lograron identificar aloinjertos histológicamente normales en los que progresó la fibrosis, mientras que el conjunto de genes predictivos discriminó e identificó con precisión aloinjertos histológicamente normales en los que finalmente progresó la fibrosis (AUC = 0,987). Los 13 genes también predijeron con precisión la pérdida temprana del injerto (AUC-0,86 y 0,83 a los 2 y 3 años respectivamente). El valor predictivo de este conjunto de genes se validó utilizando una cohorte independiente y dos conjuntos de datos de expresión independientes y disponibles públicamente.

El conjunto de genes obtenido a los 3 meses de aloinjertos renales de funcionamiento estable se correlacionó con la progresión de los marcadores establecidos para el daño crónico del aloinjerto a los 12 meses y demostró ser superior a las variables clínico-patológicas que se utilizan actualmente en la práctica clínica para identificar a los receptores de trasplantes renales en riesgo de daño y pérdida del aloinjerto.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar a un receptor de aloinjerto de riñón en riesgo de daño crónico del aloinjerto, que comprende las etapas de proporcionar una muestra de biopsia de un aloinjerto renal obtenido 3 meses después del trasplante.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona cebadores para un conjunto de firmas de 13 genes seleccionado que comprende los genes KLHL13, KAAG1, MET, SPRY4, SERINC5, CHCHD10, FJX1, WNT9A, RNF149, ST5, TGIF1, RXRA y ASB15.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de seleccionar un receptor de aloinjerto renal para tratamiento para reducir el riesgo de daño crónico del aloinjerto o FI/AT comparando el nivel de transcripción de un conjunto de firmas del gen preseleccionado obtenido del aloinjerto con el nivel de transcripción de una biblioteca de expresión para comparación y seleccionando al paciente para el tratamiento por rechazo o daño de aloinjerto si el nivel de transcripción del conjunto de firmas del gen preseleccionado es significativamente mayor que el nivel de transcripción del patrón de comparación.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un conjunto de firmas génicas para identificar pacientes en riesgo de daño renal crónico o FI/AT, que comprende los genes KLHL13, KAAG1, MET, SPRY4, SERINC5, CHCHD10, FJX1, WNT9A, RNF149, ST5, TGIF1, RXRA y ASB15.

En un aspecto adicional más, la presente invención proporciona un kit para identificar receptores de aloinjertos renales en riesgo de daño crónico del aloinjerto, que comprende, en recipientes separados que comprenden cebadores para un conjunto de firmas génicas de 13 miembros, tampones, tres genes de mantenimiento y controles negativos e instrucciones de uso.

Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a la luz de la presente memoria descriptiva, reivindicaciones que definen el alcance de la presente invención y dibujos.

10 Descripción detallada de la invención

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" normalmente significa dentro de un intervalo de error aceptable para el tipo de valor y método de medición. Por ejemplo, puede significar dentro del 20 %, más preferentemente dentro del 10 % y, lo más preferentemente todavía, dentro del 5 % de un valor o intervalo dado. Como alternativa, especialmente en sistemas biológicos, el término "aproximadamente" significa dentro de aproximadamente un registro (es decir, un orden de magnitud) preferentemente dentro de un factor de dos de un valor dado.

En el presente documento se desvela un estudio prospectivo de biopsias de protocolo en serie en puntos de tiempo predefinidos con conjuntos de datos clínicos, histológicos y moleculares. Un conjunto de genes (el conjunto de firmas génicas, KLHL13, KAAG1, MET, SPRY4, SERINC5, CHCHD10, FJX1, WNT9A, RNF149, ST5, TGIF1, RXRA, ASB15) obtenido 3 meses después del trasplante de aloinjertos renales que funcionan de manera estable se ha identificado y validado. Este conjunto de genes se puede utilizar para predecir la progresión del daño crónico del aloinjerto. Se ha descubierto que esta firma génica de riesgo molecular es superior a las variables clínico-patológicas en la identificación de receptores de trasplante renal en riesgo de progresión histológica a lesión del injerto en varias cohortes de pacientes y pérdida del injerto en una cohorte disponible públicamente. La presente invención proporciona un método para identificar receptores de aloinjertos renales en riesgo de lesión crónica del aloinjerto que emplea un conjunto de firmas génicas seleccionadas como se describe en el presente documento. Los receptores de aloinjertos que tienen una expresión aumentada del conjunto de firmas de 13 miembros tienen riesgo de lesión crónica del aloinjerto. La presente invención proporciona materiales y métodos para identificar dichos pacientes como se expone en el presente documento.

La historia natural de la lesión crónica del aloinjerto ha revelado un deterioro histológico temprano y rápido 12 meses después del trasplante (3). La presencia de cambios histológicos adversos (fibrosis y/o inflamación) a los 12 meses se correlacionó luego con los resultados adversos del aloinjerto a largo plazo en riñones de riesgo estándar y bajo (14-16). Específicamente, una puntuación del Índice de daño crónico del aloinjerto a los 12 meses (CADI-12) de ≥ 2 ha identificado a los receptores en riesgo de pérdida del injerto a los 3 años en la cohorte descrita en el presente documento y de publicaciones anteriores (5, 17). Debido al deterioro histológico más gradual observado en los aloinjertos después de 12 meses, las intervenciones en inmunoterapia una vez establecido el daño crónico del aloinjerto tienen menos probabilidades de alterar los resultados (3).

Si bien la histología del aloinjerto en un punto temporal anterior se ha correlacionado con la progresión de la neuropatía crónica del aloinjerto (NCA) y la pérdida del aloinjerto (18), no se han identificado variables clínico-patológicas que clasifican los aloinjertos en aquellos en riesgo de deterioro histológico temprano y pérdida posterior del injerto, incluso con una sensibilidad moderada. Por ejemplo, mientras que el 60 % de la cohorte tenía puntuaciones bajas de CADI (0-1) a los 3 meses, más de la mitad de los pacientes con progresión histológica del daño del aloinjerto a los 12 meses pertenecían a este grupo y no eran identificables a los 3 meses por histología solamente. También se ha observado la progresión de las puntuaciones de Banff (6) durante el primer año sin cambios detectables en la creatinina (19). En cambio, se ha observado que los cambios histológicos a los 3 meses se revierten en las evaluaciones a los 12 meses (20).

En la cohorte desvelada en el presente documento, el 40 % de los aloinjertos con CADI-3 alto habían mejorado a CADI-12 de 0-1. Por lo tanto, una aplicación clínica significativa del conjunto de firmas génicas de 13 miembros de la presente invención es la capacidad de identificar riñones en riesgo de desarrollo y progresión de NCA, actualmente no identificable solo por parámetros clínico-patológicos, en una etapa en la que son susceptibles de intervención. Además, a diferencia de una estrategia de inmunosupresión de "talla única", el conjunto de genes del presente documento tiene el potencial de estratificar los receptores de aloinjertos de bajo riesgo que luego pueden beneficiarse de una inmunosupresión reducida.

Como han demostrado muchos grupos, las causas de la lesión crónica por aloinjerto renal son diversas y acumulativas (3, 15). Esto se refleja en el número relativamente grande de genes que se asociaron con resultados adversos del aloinjerto en las 2 cohortes de validación de la técnica anterior. Einecke et al, identificaron una firma génica de tejido (886 genes relacionados con la lesión tisular, efectos del TGF- β) que fue predictivo de la pérdida del injerto en biopsias de aloinjerto por causa realizadas entre 1-31 años después del trasplante. Una firma de

conjuntos de 601 sondas de biopsias de protocolo de 6 meses en receptores pediátricos de bajo riesgo, mostró una regulación por aumento de los genes de respuesta inmunitaria en pacientes que tenían progresión histológica en comparación con aquellos que no la tenían (9). El conjunto de firmas de 13 genes de la presente invención se validó con un alto valor predictivo en todas estas cohortes con la capacidad de predecir los resultados del aloinjerto a pesar de las diferencias demográficas, la cronología de biopsias postrasplante, la presencia de fibrosis preexistente y el respectivo criterio de valoración estudiado (tabla 9). Adicionalmente, estos dos estudios de la técnica anterior utilizaron un conjunto de genes limitado basado en datos previos o rutas patológicas predichas. Por el contrario, se adoptó un enfoque todo incluido no dirigido por hipótesis facilitado por el tamaño de la muestra y basado en la naturaleza multifacética de las lesiones crónicas. Dado que CADI-12m es una variable ordinal, la lista de genes inicial se derivó sobre la base de una señal de correlación, mayor expresión génica a los 3 meses y correlación con CADI-12, en lugar de una comparación entre la expresión génica en 2 cohortes clínicas bien definidas, como en estudios previos. El método de la presente invención aumenta la solidez de la relación identificada y mejora la aplicación clínica en cohortes no definidas.

La adición de predictores clínicos predictivos de CADI-12 alto (edad del donante, sexo del receptor, órgano de donante fallecido y rechazo agudo dentro de los 3 meses posteriores al trasplante) no mejoró significativamente el desempeño del conjunto de genes en la predicción de NCA. En 20 de las biopsias de 3 meses hubo rechazo subclínico, predominantemente limitrofe. Un análisis adicional en el que se excluyó a los pacientes con rechazo celular agudo (ACR) o $i + t$ (la puntuación combinada para inflamación (i) y tubulitis (t)) > 2 demostró claramente que la inflamación no era el impulsor predominante del conjunto de firmas de 13 genes identificado con el AUC restante 1 (datos no mostrados). El nuevo enfoque no sesgado utilizado en el presente documento ha identificado, así, una firma génica de riesgo que diferencia los aloinjertos en riesgo de progresión histológica en la cohorte. La presente invención tiene una aplicabilidad más amplia para identificar riñones en riesgo como sugiere su validación para predecir la lesión y el fracaso del aloinjerto en diversas cohortes de pacientes en quienes se tomaron biopsias en diferentes puntos de tiempo después del trasplante con y sin daño preexistente.

Las biopsias de protocolo en aloinjertos que funcionan de manera estable proporcionan una ventana a los mecanismos patogénicos que se inician antes del desarrollo de una disfunción detectable del aloinjerto. Se pueden identificar rechazos subclínicos continuos, infección por poliomavirus BK, toxicidad por el inhibidor de la calcineurina (CNI) y daño mediado por anticuerpos, procesos que contribuyen a la NCA y que, cuando se detectan, pueden intervenir (24-26). Sin embargo, otros estudios no han podido demostrar diferencias significativas en los resultados del aloinjerto con intervenciones realizadas sobre fenómenos subclínicos detectados (27). Esta disparidad puede reflejar las limitaciones de usar solo la histología al interpretar las biopsias de protocolo, que pueden verse influenciadas por la variabilidad entre observadores y de muestreo. Por otro lado, se han notificado cambios en el transcriptoma de la biopsia del protocolo de 3 y 6 meses que se correlacionaron con la histología del aloinjerto a los 12 meses (11, 28) y una firma génica del aloinjerto a los 12 meses que se correlacionó con la pérdida del aloinjerto (15). Como se desvela en el presente documento, los genes cuyas expresiones se correlacionaron con CADI a los 3 o 12 meses se identificaron mediante análisis de correlaciones de Spearman y luego se sometieron a enriquecimiento general de Ontología Génica. Las funciones/rutas en Ontología Génica (GO) asociadas con genes correlacionados con CADI del análisis de correlación también se validaron con el Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos de Genes (GSEA) (9).

En una realización, la presente invención se refiere a cebadores para RT-PCR para la secuencia de firma génica de 13 miembros. En otra realización, la presente invención se refiere a un kit para identificar receptores de aloinjertos en riesgo de lesión por aloinjerto renal que comprende un recipiente que tiene cebadores para RT-PCR para un conjunto de firmas génicas de 13 miembros e instrucciones de uso. En una realización adicional, el kit comprende un primer recipiente que tiene cebadores para RT-PCR para una firma génica de 13 miembros, un segundo recipiente que tiene cebadores para los genes de mantenimiento, un tercer recipiente que contiene una solución tampón e instrucciones de uso. Los pacientes se estratifican en función de la expresión y los que tienen una alta expresión del conjunto de 13 firmas génicas se diagnostican con riesgo de daño crónico del aloinjerto y, posteriormente, se tratan para prevenir dicho daño. De acuerdo con la presente invención, los pacientes con alta expresión de los 13 genes se pueden identificar usando, por ejemplo, PCR en tiempo real, Nanostring o miSeq. En cada caso, se genera un patrón como referencia para identificar a los pacientes con riesgo de daño crónico del aloinjerto o FI/AT.

Determinación del punto de corte diagnóstico mediante RT-PCR, nanostring y miSeq

Usando un conjunto de entrenamiento de pacientes, el ARNm de la muestra de biopsia se analizará para determinar los niveles de expresión del conjunto de 13 firmas génicas. Según los datos de esta expresión, se desarrollará un modelo matemático para estimar la probabilidad de que el paciente desarrolle fibrosis en un año. Los pacientes se estratificarán según la sensibilidad/especificidad de esta puntuación, los valores predictivos positivos (VPP) y los valores predictivos negativos (VPN) determinados. Según el VPP y el VPN se establecerá un punto de corte óptimo que categorice mejor el riesgo de rechazo de los pacientes. Esto puede ser un claro corte en dos grupos, ya que si están en el grupo superior, sus niveles de expresión son significativamente más altos y tienen una alta probabilidad de desarrollar fibrosis y se determina que la prueba es positiva, pero si están en la parte inferior, tienen una probabilidad muy baja de desarrollar fibrosis y se determina que la prueba es negativa. En una realización alternativa, los pacientes pueden dividirse en terciles en función de su puntuación de probabilidad determinada como

se ha indicado anteriormente. En este caso, si el paciente está en (1) el tercil superior, sus niveles de expresión son significativamente más altos y tienen una alta probabilidad de desarrollar fibrosis y se determina que la prueba es positiva; (2) si están en el segundo tercil o grupo intermedio, su riesgo no se puede determinar con precisión; y (3) si están en el tercil inferior, tienen una probabilidad muy baja de desarrollar fibrosis. y se determina que la prueba es negativa.

El kit de ensayo de RT-PCR incluye:

1) Recipiente de cebador (16 tubos con un ensayo de qPCR por tubo para 16 genes, incluido el conjunto de firmas génicas de 13 paneles de la presente invención y genes de mantenimiento (ACTB y GAPDH) y la sonda de control 18s). Los ensayos se adquirieron en LifeTech. Los cebadores se exponen más adelante.

Cebadores para el ensayo de qPCR		
ID de ensayo (LifeTech®)	Disponibilidad	Símbolo(s) de los genes
Hs99999901_s1	-	ARNr 18s
Hs01060665_g1	INV*	ACTB
Hs02758991_g1	INV	GAPDH
Hs01067640_m1	INV	RXRA
Hs00243321_ml	INV	WNT9A
Hs00534909_s1	INV	FJX1
Hs01006506_m1	INV	KLHL13
Hs00698334_m1	INV	SERINC5
Hs01935412_s1	INV	SPRY4
Hs00704044_s1	INV	KAAG1
Hs01565584_m1	INV	MET
Hs00395880_m1	INV	ASB15
Hs00936461_m1	INV	ST5
Hs01369775_g1	INV	CHCHD10
Hs00411860_m1	INV	RNF149
Hs00820148_g1	INV	TGIF1

2) TaqMan® Universal Master Mix II: reactivos para las reacciones de qPCR

3) PLACA DE 96 POCILLOS ARRAY TaqMan® 6x16

4) Kit de síntesis de ADNc de Agilent AffinityScript QPCR: para la conversión de ARN a ADNc de mayor eficiencia y totalmente optimizada para aplicaciones de PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) * INV = Inventario

Procedimiento experimental y análisis de datos:

El ARN total se extraerá de las muestras de biopsia del aloinjerto utilizando el kit Allprep (kit QIAGEN-ALLprep, Valencia, CA, EE.UU.). El ADNc se sintetizará utilizando el kit AffinityScript RT con cebadores oligo dt (Agilent Inc. Santa Clara, CA). Ensayos de qPCR TaqMan para el conjunto de 13 firmas génicas, 2 genes de mantenimiento (ACTB, GAPDH) y 18s se adquieren en ABI Life Technology (Grand Island, NY). Los experimentos de qPCR se realizarán en ADNc usando la mezcla universal TAQMAN y las reacciones de PCR se monitorizarán y adquirirán usando un sistema ABI7900HT. Las muestras se medirán por triplicado. Se generarán los valores de los tiempos de ciclo (CT) para el conjunto de firmas génicas de 13 miembros, así como los 2 genes de mantenimiento. El valor de ΔCT de cada gen se calculará restando el valor de CT promedio para los genes de mantenimiento del valor de CT de cada gen y luego se aplicará un modelo de ajuste de regresión logística penalizado utilizando un paquete *logistf* R en los valores de ΔCT para derivar el modelo estadístico a partir del cual se calculará la puntuación de probabilidad alta para cada paciente.

$$\log \frac{p(x)}{1-p(x)} = \beta_0 + \beta_1 g_1 + \beta_2 g_2 + \dots + \beta_{13} g_{13}$$

donde $p(x)$ es la probabilidad de un CADI alto, β_i^* es el coeficiente penalizado y g_i es la expresión ΔCT del gen i) Según la puntuación de probabilidad, la predicción de AUC, la sensibilidad/especificidad, se determinarán los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) determinados. Con una especificidad dada (90 %), se establecerá un punto de corte óptimo que categorice mejor el riesgo de fibrosis renal del paciente.

Ejemplo A

Una cohorte independiente de 45 pacientes de cohorte (18: CADI ≥ 2 y 27: CADI < 2) se utilizó como conjunto de entrenamiento para el ensayo de qPCR. Las muestras de ARN se extrajeron y se sometieron a experimentos de qPCR utilizando este kit de ensayo de qPCR. Después de la adquisición y normalización de datos, se construyó un modelo logístico penalizado con los siguientes valores de β (Tabla 1) y el AUC de predicción en el conjunto de entrenamiento fue 0,866. El modelo estadístico basado en el conjunto de entrenamiento se utilizará para predecir la probabilidad de fibrosis renal para nuevas muestras y el punto de corte de probabilidad es 0,548 con una especificidad del 90 %.

Tabla 1. Parámetros para el modelo de regresión logística penalizado del conjunto de entrenamiento de qPCR

	β	sd(β)	95 inferior	95 superior	Chi cu
(Intersección)	-0,365	5,499985	11,1826	10,41205	0,005216
KLHL13	0,121359	0,121611	0,06046	0,514791	1,642695
MET	-0,31735	0,247157	0,93868	0,066704	2,564086
KAAG1	0,279196	0,532691	0,75299	1,40152	0,266769
SERINC5	0,110388	0,492916	-0,785	1,022298	0,06097
CHCHD10	0,594793	0,513221	0,32058	1,637405	1,58411
SPRY4	-0,39334	0,721153	2,26251	0,839415	0,349045
FJX1	0,204501	0,33905	0,43074	0,932129	0,403804
RNF149	0,06954	0,457496	0,73284	0,898595	0,03126
ST5	0,740591	0,767047	0,48276	2,930863	1,272416
TGIF1	-0,40004	0,454692	1,32842	0,344652	1,089256
RXRA	-0,28701	0,237485	0,76594	0,099958	2,098098
ASB15	-0,23106	0,173426	-0,6974	0,062775	2,251056

Kit de ensayo Nanostring:

El kit de ensayo Nanostring incluye:

- 1) Conjunto de códigos personalizado (conjuntos de sondas con código de barras para el panel de 13 genes que incluyen 3 genes de mantenimiento y controles negativos proporcionados por Nanostring) Envase
- 2) nCounter® Master Kit que incluye nCounter Cartridge, nCounter Plate Pack y nCounter Prep Pack
- 3) QIAGEN RNeasy® Kit para extracción de ARN total de alta calidad

Experimentos de Nanostring:

El ARN total se extraerá con el kit QIAGEN RNeasy® siguiendo el protocolo del fabricante; Las sondas de código de barras se hibridarán con el ARN total en solución a 65 °C con el kit maestro. La sonda de captura capturará el objetivo que se inmovilizará para obtener datos.

Después de la hibridación, la muestra se transferirá a Counter Pre Station y la sonda/objetivo se inmovilizará en el nCounter Cartridge y, a continuación, el analizador digital nCounter Digital Analyzer contará las sondas.

Análisis de datos transcriptómicos de ARNm

Los datos de recuento en bruto del analizador Nanostring se procesarán en el siguiente procedimiento: los datos de recuento en bruto se normalizarán en primer lugar al recuento de los genes de mantenimiento y se filtrarán los ARNm con recuentos inferiores a la mediana más 3 desviaciones estándar de los recuentos de controles negativos.

Debido a la variación de datos que surge del lote de reactivo, el recuento de cada ARNm de diferentes lotes de reactivos se calibrará multiplicando un factor de la relación de los recuentos promediados de las muestras en diferentes lotes de reactivos. Los recuentos calibrados de diferentes lotes experimentales se ajustarán aún más mediante el paquete ComBat.

5 A continuación, se aplicará un modelo de ajuste de regresión logística penalizado que utiliza el paquete *logistf* R sobre los valores de recuento normalizados para derivar el modelo estadístico a partir del cual se calculará la puntuación de probabilidad para cada paciente.

10 Los datos de recuento en bruto del analizador Nanostring se procesarán en el siguiente procedimiento: los datos de recuento en bruto se normalizarán primero al recuento de los genes de mantenimiento y se filtrarán los ARNm con recuentos inferiores a la mediana más 3 desviaciones estándar de los recuentos de los controles negativos. Debido a la variación de datos que surge del lote de reactivo, el recuento de cada ARNm de diferentes lotes de reactivos se calibrará multiplicando un factor de la relación de los recuentos promediados de las muestras en diferentes lotes de reactivos. Los recuentos calibrados de diferentes lotes experimentales se ajustarán aún más mediante el paquete ComBat.

15 A continuación, se aplicará un modelo de ajuste de regresión logística penalizado que utiliza el paquete *logistf* R sobre los valores de recuento normalizados para derivar el modelo estadístico a partir del cual se calculará la puntuación de probabilidad de alta probabilidad para cada paciente.

$$\log \frac{p(x)}{1-p(x)} = \beta^*_0 + \beta^*_1 g_1 + \beta^*_i g_i + \dots + \beta^*_{13} g_{13}$$

25 donde $p(x)$ es la probabilidad de un CADI alto, β^*_i es el coeficiente penalizado y g_i es el recuento del gen i)
 Según la puntuación de probabilidad, la predicción de la AUC, la sensibilidad/especificidad, se determinarán los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN). Con una especificidad dada (90 %), se establecerá un punto de corte óptimo que categorice mejor el riesgo de fibrosis renal del paciente. Esto puede ser un claro punto de corte en dos grupos, ya que si están en el grupo superior tienen una alta probabilidad de desarrollar fibrosis y se determina que la prueba es positiva, pero si están en la parte inferior tienen una probabilidad muy baja de desarrollar fibrosis y se determina que la prueba es negativa. La alternativa es que los pacientes pueden dividirse en terciles según lo anterior, su puntuación de probabilidad determinada como se ha indicado anteriormente. En este caso, si el paciente se encuentra en (1) el tercil superior, tiene una alta probabilidad de desarrollar fibrosis y se determina que la prueba es positiva; (2) están en el segundo tercil o grupo intermedio, su riesgo no se puede determinar con precisión; y (3) están en la parte inferior, tienen una probabilidad muy baja de desarrollar fibrosis y se determina que la prueba es negativa.

35 Experimentos MiSEQ:

El kit de ensayo MiSEQ incluirá:

- 40 1) Custom Assay (conjuntos de sondas con código de barras para el panel de 13 genes, incluido el panel de 5 genes de mantenimiento)
- 2) Illumina® TruSeq® RNA Sample Preparation Kit v2
- 45 3) QIAGEN RNeasy® Kit para extracción de ARN total de alta calidad

Experimentos MiSEQ:

El ARN total se extraerá con el kit QIAGEN RNeasy®. La biblioteca de secuenciación se generará utilizando Illumina® TruSeq® RNA Sample Preparation Kit v2 siguiendo el protocolo del fabricante: brevemente, el ARNm que contiene poliA se purificará primero y se fragmentará a partir del ARN total. La síntesis de ADNc de la primera cadena se realizará utilizando un cebador hexámero aleatorio y transcriptasa inversa seguida de la síntesis de ADNc de la segunda cadena. Después del proceso de reparación final, que convierte los salientes en extremos romos de ADNc, se añadirán múltiples adaptadores de indexación al final del ADNc bicatenario. A continuación, se realizará una PCR para enriquecer los objetivos utilizando los pares de cebadores específicos para el panel de genes y los genes de mantenimiento. Finalmente, las bibliotecas indexadas serán validadas, normalizadas y agrupadas para la secuenciación en el secuenciador MiSEQ.

Análisis de datos transcriptómicos de ARNm

60 Los datos de RNAseq en bruto generados por el secuenciador MiSEQ se procesarán mediante el siguiente procedimiento: Las lecturas con buena calidad se alinearán en primer lugar con varias bases de datos de referencia humanas, incluido el genoma humano hg19, exón, unión de corte y empalme de unión y base de datos de contaminación, incluyendo secuencias de ARN de ribosomas y mitocondrias utilizando el algoritmo de alineación BWA conocido. Después de filtrar las lecturas asignadas a la base de datos de contaminación, las lecturas que están

alineadas de forma única con un máximo de 2 apareamientos de bases erróneas con las regiones de amplificación deseadas se contarán después como nivel de expresión para el gen correspondiente y se someterán además a la normalización de cuantiles en las muestras después de la transformación log2.

- 5 A continuación, se aplicará un modelo de ajuste de regresión logística penalizado que utiliza el paquete *logistf* R sobre los valores de recuento normalizados para derivar el modelo estadístico a partir del cual se calculará la puntuación de probabilidad de alta probabilidad para cada paciente.

$$\log \frac{p(x)}{1-p(x)} = \beta^*_0 + \beta^*_1 g_1 + \beta^*_i g_i + \dots + \beta^*_{13} g_{13}$$

- 10 (donde $p(x)$ es la probabilidad de un CADi alto, β^*_i es el coeficiente penalizado y g_i es el recuento del gen i). Según la puntuación de probabilidad, la predicción de la AUC, la sensibilidad/especificidad, se determinarán los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN). Con una especificidad dada (90 %), se establecerá un punto de corte óptimo que categorice mejor el riesgo de fibrosis renal del paciente. Esto puede ser un claro punto de corte en dos
- 15 grupos, ya que si están en el grupo superior tienen un nivel de transcripción significativamente más alto del conjunto de firmas génicas de 13 miembros y tienen una alta probabilidad de desarrollar fibrosis y se determina que la prueba es positiva, pero si están en la parte inferior tienen una probabilidad muy baja de desarrollar fibrosis y se determina que la prueba es negativa. La alternativa es que los pacientes pueden dividirse en terciles según lo anterior, su puntuación de probabilidad determinada como se ha indicado anteriormente. En este caso, si el paciente se
- 20 encuentra en (1) el tercil superior, tiene un nivel de transcripción significativamente más alto del conjunto de firmas génicas de 13 miembros y una alta probabilidad de desarrollar fibrosis y se determina que la prueba es positiva; (2) están en el segundo tercil o grupo intermedio, su riesgo no se puede determinar con precisión; y (3) están en la parte inferior, tienen una probabilidad muy baja de desarrollar fibrosis y se determina que la prueba es negativa.

- 25 El desarrollo de un conjunto de genes predictivos que identifica poco después del trasplante a los pacientes que tienen un mayor riesgo de lesión progresiva del injerto tiene varias aplicaciones: terapia de individualización basada en el perfil de riesgo, incluida la selección de individuos "en riesgo" para una terapia de individualización temprana basada en el perfil de riesgo que incluye dirigirse a individuos "en riesgo" para una intervención temprana y
- 30 minimizar la terapia en aquellos con buen pronóstico. Además, se puede utilizar para la estratificación del riesgo en ensayos clínicos, lo que permite probar nuevos regímenes terapéuticos en poblaciones específicas.

En resumen, se ha desarrollado y validado una firma génica de biopsias de protocolo de aloinjertos renales que funcionan de manera estable a los 3 meses. La firma génica identifica a los receptores de aloinjertos de riñón en riesgo de deterioro histológico y deterioro funcional a los 12 meses. Esta firma génica fue validada externamente

35 para predecir aloinjertos que sufrieron diversos resultados adversos, que representan los riñones en riesgo a medio y largo plazo. La firma génica también tiene el potencial de identificar receptores de aloinjertos de menor riesgo que pueden beneficiarse con menos intensidad.

La presente invención se refiere a métodos para identificar receptores de aloinjertos de riñón que están en riesgo de desarrollar una lesión crónica del injerto, expresada como fibrosis intersticial y atrofia tubular (FI/AT). Los pacientes pueden monitorizarse a los 3, 6, 9, 12 meses y, posteriormente, anualmente. Cuando se identifica que los pacientes

40 tienen riesgo de desarrollar una lesión crónica del aloinjerto, la presente invención incluye métodos para tratar tales pacientes. Los enfoques de tratamiento serían los siguientes: en pacientes identificados como de alto riesgo de fibrosis crónica del aloinjerto con bajo riesgo inmunológico determinado por parámetros, incluidos ausencia del rechazo agudo, rechazo subclínico, incluido rechazo subclínico limitrofe en la biopsia según lo definido por los

45 criterios de Banff (American Journal of Transplantation 2008; 8: 753-760), anticuerpos específicos del donante y un panel de anticuerpos reactivos calculado bajo (PRA, una medida de anticuerpos anti-HLA), los métodos incluyen, sin limitación, retirada del inhibidor de la calcineurina (CNI), tales como ciclosporina o tacrolimus, y sustitución por un fármaco inmunosupresor menos fibrogénico, TAL como belatacept o sirolimus; y, en aquellos pacientes identificados

50 como de alto riesgo de fibrosis crónica del aloinjerto con rechazo subclínico, incluido rechazo subclínico Limitrofe en la biopsia, según la definición de los criterios de Banff (American Journal of Transplantation 2008; 8: 753-760), dado que el rechazo subclínico puede contribuir al desarrollo de fibrosis, los métodos incluyen, sin limitación, aumento de la inmunosupresión, tal como un aumento de la dosis de inhibidor de la calcineurina (CNI), tal como ciclosporina o tacrolimus o adición de otro agente, tal como prednisona o micofenolato de mofetilo.

55 Además, los pacientes que se identifica que están en riesgo de desarrollar una lesión crónica del aloinjerto pueden tratarse con agentes antifibróticos, tal como pirfenidona, relaxina, proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7), factor de crecimiento hepático (HGF) 6.

- 60 La presente invención se describe a continuación usando ejemplos con los que se pretende describir más la invención sin limitar el alcance de la misma.

En los ejemplos siguientes, se utilizaron los siguientes materiales y métodos.

Población de pacientes y muestras de biopsia

Los criterios de exclusión para los pacientes descritos en el presente documento incluyeron una compatibilidad cruzada T/B-CDC positiva, desensibilización para anticuerpos específicos del donante, receptores pediátricos e incapacidad para dar su consentimiento. Se obtuvieron biopsias de aloinjerto renal de protocolo a los 0, 3, 12 y 24 meses postrasplante en 3 lugares, y a los 0 y 24 meses en 2 lugares. Se realizaron biopsias de protocolo a los tres meses a 244 pacientes, 204 de los cuales tenían una biopsia correspondiente a los 12 meses. Se realizó una micromatriz en las primeras 159 biopsias de protocolo de 3 meses en adelante "m3_Bx") y las 45 restantes se utilizaron para validación.

Colección de datos

Los datos de donantes y receptores se recopilaron al inicio del estudio. La información del donante incluyó la edad del donante, la raza, el sexo, HLA, la causa de la muerte, el estado de vivo frente a fallecido (SCD, ECD o DCD). Los datos del receptor incluyeron la edad, el sexo, la raza, la causa de la enfermedad renal en etapa terminal (ESRD) HLA, PRA, anticuerpos anti-HLA, el tiempo isquémico frío (CIT), la función retardada del injerto (DGF), la inmunosupresión de inducción y mantenimiento, el estado de citomegalovirus (CMV), los estados del virus de la hepatitis C (VHC) y del virus de la hepatitis B (VHB), la duración 3, 6, 12 y 24 meses, incluyendo exploración física, infecciones actuales, resultados de laboratorio (CBC, BUN, creatinina, panel metabólico y niveles de inmunosupresión). Además, los datos clínicos se recopilaron cuando se realizó una biopsia clínicamente indicada.

Prueba de detección de anticuerpos HLA

Se analizó el suero para detectar anticuerpos anti-HLA circulantes al inicio del estudio utilizando perlas One Lambda Labscreen® (One Lambda Inc, Canoga Park, CA). Se consideró positiva una intensidad media de fluorescencia (MFI) > 1.000. Las muestras se analizaron en un Luminex LabScan 200™ usando el software HLA Fusion. Los anticuerpos específicos del donante (DSA) se determinaron utilizando la tipificación de HLA del donante y del receptor. Se excluyó del estudio a los pacientes con DSA preformados que requerían protocolos de desensibilización antes o en el momento del trasplante.

Histopatología y clasificación diagnóstica

Se tomaron dos núcleos de tejido de cada una de las biopsias renales de protocolo de 3 meses y 1 año de la cohorte de estudio. Un núcleo se procesó para histología y el otro núcleo se procesó para ARNm. Cuando solo se pudo obtener un núcleo, se dio prioridad al ARNm.

Las biopsias renales se procesaron y leyeron de forma centralizada. Las secciones incluidas en parafina y fijadas en formalina se procesaron para tinciones histológicas (hematoxilina y eosina, ácido peryódico de Schiff, tricrómico y tinciones elásticas Weigerts). La inmunohistoquímica para C4d se realizó en un teñidor automático en secciones de parafina teñidas con un anticuerpo policlonal de conejo (American Research Products, Inc.). Todas los portaobjetos se escanearon con un escáner de portaobjetos completo (Aperio CS) y las imágenes digitales de alta resolución se archivaron en una base de datos de imágenes.

Las biopsias se evaluaron y puntuaron por separado por 2 anatomopatólogos renales, sin conocimiento de los datos clínicos, utilizando la conocida Clasificación de Banff 2007 revisada para la anatomopatología del aloinjerto renal (6). Cuando los diagnósticos fueron discordantes, se realizó una reunión con un tercer anatomopatólogo para un diagnóstico de consenso. La puntuación se realizó en todas las imágenes del portaobjetos completo para todos los casos. Las puntuaciones se introdujeron en una base de datos Filemaker Pro personalizada que calculó las categorías de Banff y el Índice de Daño Crónico de Aloinjertos (CADI).

Experimentos en micromatriz, análisis de datos y validación cruzada

Los detalles de los experimentos de micromatrices y el análisis de datos se describen a continuación. En resumen, se extrajeron muestras de ARN total de muestras de biopsia y se sometieron a experimentos de micromatriz utilizando la matriz de exón humano Affymetrix 1.0 ST. Los datos de intensidad a nivel de gen se extrajeron con el algoritmo RMA 7 y se corrigieron para el efecto de lote experimental utilizando el paquete 8 ComBat R de código abierto después de la evaluación de calidad. Los genes cuyas expresiones se correlacionaron con CADI a los 3 o 12 meses se identificaron mediante análisis de correlaciones de Spearman y, a continuación, se sometieron a enriquecimiento general en Ontología Génica. Las funciones/rutas de GO asociadas con genes correlacionados con CADI del análisis de correlación también se validaron con el Análisis de Enriquecimiento del Conjunto de Genes (GSEA) (9).

Para identificar un conjunto mínimo de genes para predecir la fibrosis renal futura, se empleó un conjunto de genes de foco. El conjunto de genes se asoció específicamente con CADI de 12 meses según lo determinado por un análisis de aleatorización de 100 veces seguido de la corrección de los parámetros clínicos de confusión (CIT, donante fallecido, edad del donante, anticuerpos anti HLA, rechazo agudo). Se identificó un conjunto de genes

5 óptimo con la mejor puntuación AUC de predicción después de 5.000 iteraciones de un modelo de ajuste de regresión logística penalizado en el conjunto de genes de foco. El conjunto de genes se validó de forma cruzada utilizando un método de validación cruzada de 3 veces con 100 iteraciones en nuestros datos. El conjunto de genes se validó aún más mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en una cohorte de pacientes independiente y también mediante el análisis de tres conjuntos de datos independientes disponibles públicamente de diferentes plataformas de matriz (11-13). Los archivos de expresión de micromatriz se publican en el sitio web de Gene Expression Omnibus (GSE).

10 Análisis estadístico de datos clínicos

10 Se utilizaron estadísticas descriptivas (medias y desviaciones estándar) para resumir las características basales de donantes y receptores, y se compararon entre los grupos de estudio (CADI-12 alto frente a CADI-12 bajo, con progresión frente a sin progresión) utilizando la prueba de chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher. Las comparaciones univariadas de variables continuas se realizaron mediante una prueba T no pareada (prueba de Mann-Whitney para el análisis no paramétrico correspondiente). Se trazaron curvas de Kaplan-Meier para la duración del estudio, con pérdida del injerto (no censurado por muerte) como resultado. Las curvas de supervivencia de los diferentes grupos se compararon mediante la prueba de rango logarítmico y las pruebas de Gehan-Breslow-Wilcoxon. $P < 0,05$ se consideró significativa (GraphPad Prism versión 5.03, Graphpad inc, La Jolla, CA). Para determinar los factores predictivos de tener un CADI alto (puntuación ≥ 2) a los doce meses del trasplante, Se realizó una regresión logística múltiple utilizando la selección de predictores hacia atrás. Los predictores evaluados fueron: edad del donante, raza del donante, sexo del donante, estado del donante, rechazo agudo antes de los 3 meses, raza del receptor, sexo del receptor, donante de criterios expandidos, terapia inmunosupresora de inducción y mantenimiento y la presencia de anticuerpos anti-HLA. El tiempo de isquemia fría y la función retardada del injerto se consideraron en un análisis de subgrupos que incluyó únicamente donantes fallecidos. Se construyeron modelos logísticos utilizando los mismos predictores para evaluar los factores predictivos de progresión al mes 12 en la población de trasplantes completos y en la población de donantes fallecidos únicamente. Todos los análisis se completaron utilizando SAS versión 9.2 (SAS, Cary, Carolina del Norte).

30 Métodos suplementarios

30 Obtención de datos clínicos

35 Los datos de donantes y receptores se recopilaron al inicio del estudio. La información del donante incluyó la edad, la raza, el sexo, el genotipo HLA, la causa de muerte y el estado del aloinjerto (es decir, SCD, ECD o DCD). Los datos del receptor incluyeron la edad, el sexo, la raza, la causa de ESRD, el genotipo HLA, PRA, la presencia y el tipo de anticuerpos anti-HLA, el estado de coincidencia cruzada, el tiempo de isquemia fría (CIT), la función retardada del injerto (DGF), el régimen de inmunosupresión, el estado de CMV, el estado de VHC y VHB, el estado de diálisis, la modalidad de diálisis, el historial de transfusiones, los antecedentes de embarazo y los trasplantes previos.

40 Histopatología:

45 Se tomaron dos núcleos de tejido de cada una de las biopsias renales de protocolo de 3 meses y 1 año de la cohorte de Genómica de la cohorte de Rechazo Crónico del Aloinjerto (GoCAR). Un núcleo se procesó para histología y el otro núcleo se procesó para ARNm. Cuando solo se pudo obtener un núcleo, se dio prioridad al ARNm a los 3 meses y a la histología a los 12 meses. Las biopsias renales se procesaron y leyeron de forma centralizada. Las secciones incluidas en parafina y fijadas en formalina se procesaron para tinciones histológicas (hematoxilina y eosina, ácido peryódico de Schiff, tricrómico y tinciones elásticas Weigerts). La inmunohistoquímica para C4d se realizó en un teñidor automático en secciones de parafina teñidas con un anticuerpo policlonal de conejo (American Research Products, Inc.). Todos los portaobjetos se escanearon con un escáner de portaobjetos completo (Aperio CS) e imágenes digitales de alta resolución y se archivaron en una base de datos de imágenes.

55 Las biopsias se evaluaron y puntuaron por separado por 2 anatomopatólogos renales, sin conocimiento de los datos clínicos, utilizando la clasificación revisada de Banff 2007 para anatomopatología del aloinjerto renal 1 (referencia SIS). Cuando los diagnósticos fueron discordantes, se realizó una reunión con un tercer anatomopatólogo para un diagnóstico de consenso. La puntuación se realizó en todas las imágenes del portaobjetos completo para todos los casos. Las puntuaciones se introdujeron en una base de datos Filemaker Pro personalizada que calculó las categorías de Banff y el Índice de Daño Crónico de Aloinjertos (CADI). La puntuación CADI es una puntuación compuesta que incluye seis componentes histológicos: esclerosis de la íntima vascular (cv), atrofia tubular (ct), fibrosis intersticial (ci), inflamación intersticial (i), aumento de la matriz mesangial (mm) y glomeruloesclerosis (g). Cada componente se puntúa entre 0 y 3, dando una puntuación máxima posible de 18. Varios autores 2-3 han validado las puntuaciones CADI en biopsias de protocolo para que se correlacionen directamente con los resultados.

65 Experimentos en micromatriz

El ARN total se extrajo de muestras de biopsia de aloinjerto percutáneo obtenidas 3 meses después del trasplante

utilizando el kit All prep (kit QIAGEN-ALLprep, Valencia, CA, EE.UU.) y se estabilizó con RNA-later (Qiagen, Inc). La calidad del ARN se evaluó utilizando Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Las muestras con un número de integridad de ARN superior a ocho se utilizaron en experimentos de micromatriz posteriores. Se utilizaron matrices 1.0 ST de ratón Affymetrix siguiendo el protocolo estándar proporcionado por el fabricante (Affymetrix Inc.). En resumen, se aplicó un kit de amplificación y etiquetado ENCORE (NuGen, San Carlos, CA) al primer lote de muestras comenzando con aproximadamente 100 ng de ARN total para generar fragmentos de ARN marcados con biotina para la hibridación con el chip. Para muestras con baja concentración de ARN, se aplicó el kit de amplificación Nugen Ovation PICO (NuGen, San Carlos, CA). Los chips se escanearon usando GeneChip Scanner 7G (Affymetrix Inc.).

Procesamiento de datos de micromatriz

Los datos de intensidad de los experimentos de micromatriz a nivel de genes se extrajeron y resumieron con el algoritmo RMA4. La calidad de los datos se evaluó mediante la Affymetrix Expression Console (Affymetrix Inc). Los conjuntos de sondas de control de Affymetrix y los conjuntos de sondas con baja intensidad en todas las muestras se excluyeron del análisis posterior. Los efectos por lotes se ajustaron utilizando el paquete ComBat R5.

Análisis bioinformáticos

El flujo de trabajo del análisis bioinformático se realizó con paquetes estadísticos R. El objetivo de los análisis fue derivar un conjunto relativamente robusto de genes (~ 10-20) que predice el desarrollo de nefropatía crónica por aloinjerto.

Identificación de la firma transcripcional del aloinjerto:

Se realizaron análisis de correlación de Spearman en los datos de expresión génica del aloinjerto de 3 meses para la puntuación CADI del aloinjerto de 3 meses (CADI-3) así como la puntuación CADI de 12 meses (CADI-12). El coeficiente de correlación y el valor p para la relación entre el nivel de expresión y la puntuación CADI se calcularon para cada gen. La pendiente de la expresión génica frente a la puntuación CADI también se calculó utilizando un modelo de regresión lineal. Se seleccionaron genes con un valor de $p < 0,05$. Se generaron dos listas de genes con $p < 0,05$ correspondientes a las puntuaciones CADI de 3 meses o de 12 meses. Los mecanismos anotados funcionales y moleculares de estas dos listas de genes se determinaron mediante análisis de enriquecimiento por Ontología Génica (GO) basado en la prueba exacta de Fisher. Como alternativa, se analizó el conjunto de datos de expresión génica para determinar las funciones biológicas que se enriquecen en biopsias con puntuaciones CADI más altas. Para lograr esto, se aplicó el análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (GSEA) (6-7) a todo el conjunto de datos de micromatriz y se determinaron las funciones de los genes que se enriquecen en muestras con una puntuación alta de CADI ($CADI \geq 2$) frente a aquellas con una puntuación baja de CADI ($CADI < 2$). Se determinaron los términos de GO superiores asociados con los grupos de CADI alto y bajo, y se compararon con los resultados del análisis de enriquecimiento de GO derivados de los análisis de correlación entre el nivel de expresión génica y la puntuación CADI descritos anteriormente.

Análisis de predicción:

Para derivar un conjunto de genes centrales más significativo de la gran lista de genes que tienen una asociación estadísticamente significativa con las puntuaciones CADI, la lista de genes se filtró aplicando varios modelos de predicción estadística. En primer lugar, toda la cohorte de pacientes se asignó aleatoriamente a 2 grupos en una proporción de 1:1. Se aplicó el análisis de correlación de Spearman para determinar los genes con niveles de expresión que se correlacionaron con la severidad de la puntuación CADI a los 3 y 12 meses. La aleatorización 1:1 se repitió 100 veces y se realizó un análisis de correlación de la expresión génica con la puntuación CADI a los 3 y 12 meses para cada una de las 100 iteraciones. Los genes que ocurrieron más de dos veces en las 100 iteraciones de la aleatorización con una correlación de una $P < 0,05$ con CADI en ambos grupos se consideraron como un conjunto de genes centrales a partir del cual se identificó un conjunto de predicción mínima para predecir la fibrosis renal. Los genes que eran exclusivos del conjunto de genes centrales de CADI-12 (es decir, genes no compartidos con el conjunto de genes centrales CADI-3) se derivaron y se filtraron mediante la corrección de los factores de confusión clínicos (edad del donante, donante vivo frente a donante fallecido, sexo y raza del donante, CIT min, terapia de inducción, anticuerpos anti-HLA de clase I y II) mediante análisis de regresión lineal múltiple, así como la exclusión de genes con una mediana de intensidad \log_2 baja de menos de 5.

Finalmente, se realizó un ajuste de modelo logístico iterativo (5.000 iteraciones) con el fin de identificar un conjunto de genes mínimo y óptimo para la predicción de fibrosis renal futura. Inicialmente, se seleccionaron al azar 20 genes del conjunto de genes centrales de CADI-m12 filtrados. Los datos de expresión del grupo de 20 genes se ajustaron al modelo de regresión logística penalizado para la predicción de CADI alto ($CADI \geq 2$) y bajo ($CADI < 2$). Los genes con asociación significativa con CADI alto/bajo ($p < 0,05$) se identificaron a partir del modelo de regresión para cada uno del grupo de 20 genes. Las etapas anteriores se repitieron 5.000 veces. Se identificaron genes estadísticamente significativos ($P < 0,05$) de cada operación iterativa. Se calculó la aparición de genes significativos de las 5.000 iteraciones. Finalmente, los 40 genes principales clasificados por el número de apariciones se volvieron a aplicar al

modelo de regresión logística penalizado para la predicción de CADI alto frente a bajo. Los genes estadísticamente significativos ($P < 0,05$) que utilizan este modelo se consideraron el conjunto de genes óptimo final. La puntuación de el AUC y la sensibilidad y la especificidad se calcularon a partir del modelo de regresión logística utilizando el conjunto de genes óptimo final. Las curvas de características operativas del receptor del conjunto de genes óptimo final se compararon con conjuntos de genes seleccionados al azar de igual tamaño para predecir CADI alto frente a bajo para demostrar que el conjunto de genes óptimo final dio la mejor predicción. Además, se seleccionaron 10.000 conjuntos de genes seleccionados al azar y se calcularon las AUC de estos conjuntos de genes y se compararon con el AUC del conjunto de genes óptimo final.

El conjunto de genes óptimo final se validó de forma cruzada utilizando un método de validación cruzada de tres veces. En resumen, los pacientes se dividieron aleatoriamente en 3 grupos de igual tamaño y el mismo número de pacientes con CADI alto y bajo y los datos de dos grupos cualesquiera se utilizaron como conjunto de entrenamiento con el tercero como conjunto de predicción. El modelo de regresión logística penalizado que se construyó en el conjunto de entrenamiento se aplicó al conjunto de predicción para predecir el resultado y las tasas de verdaderos y falsos positivos. La precisión de la predicción se calculó a partir del conjunto de datos de predicción y luego se promedió a partir de tres posibles permutaciones. Las etapas se repitieron más de 100 veces. Se calcularon las tasas globales de positivos verdaderos o falsos y la precisión de la predicción. Se trazó la distribución de las AUC en el conjunto de pruebas en función del modelo derivado utilizando el conjunto de entrenamiento para 100 iteraciones. Para evaluar aún más la confianza de la predicción, las etiquetas de grupo se asignaron aleatoriamente a los pacientes y el AUC se calculó sobre los datos permutados de la etiqueta de grupo. Las etapas anteriores se repitieron 10.000 veces y se calculó la proporción de AUC de 10.000 iteraciones más altas que las AUC originales.

También se realizó la predicción de CADI alto/bajo en diferentes umbrales de CADI-12 (CADI-12 ≥ 3 alto o CADI-12 ≥ 4 alto) para evaluar la solidez de la predicción de 13 conjuntos de genes. Para investigar si la predicción por el conjunto de genes es superior a la predicción por variables clínicas, se realizó una regresión logística multivariada para la predicción de CADI-12 alto/bajo al incluir las siguientes variables demográficas/clínicas: CADI-3, edad del donante, donante fallecido, riñón ECD, DGF, sexo, raza, CIT_min, terapia de inducción, Ab anti-HLA de clase I, Ab anti-HLA de clase II, Tacrolimus y CYA. Después de la selección escalonada, las variables que siguieron siendo significativas se utilizaron en el modelo final. A continuación, se calculó el AUC para la curva ROC del modelo final y se comparó con la predicción CADI-12 con el conjunto de genes. Por último, para comprobar si la inflamación fue la causa del conjunto de 13 genes, la precisión de la predicción del rechazo agudo se evaluó a los 12 meses en 101 pacientes y el CADI-12 alto/bajo para los pacientes sin rechazo agudo.

Para probar si el conjunto de genes podría predecir la pérdida temprana del injerto después del trasplante para los 155 pacientes originales después de la exclusión de los 4 pacientes que murieron con un injerto en funcionamiento, en primer lugar se aplicó un modelo de predicción de regresión logística con el conjunto de genes solo entre aquellos pacientes que habían tenido pérdida del injerto en los 3 años o habían sido seguidos durante al menos tres años sin pérdida del injerto y se calculó la AUC. En segundo lugar, se realizó un análisis de supervivencia en los 155 pacientes para examinar si el conjunto de genes está asociado con la pérdida del injerto: el análisis de componentes principales (PCA) sobre los datos de expresión de los 13 genes se realizó inicialmente y los 10 componentes principales (PC) principales se aplicaron al modelo de riesgos proporcionales de Cox del tiempo hasta la pérdida del injerto. Se seleccionaron los componentes principales (PC) que estaban significativamente asociados con la pérdida del injerto ($p < 0,05$) y se utilizó la combinación lineal de valores propios de componentes significativos multiplicados por los coeficientes de los PC correspondientes del modelo de Cox como puntuación de riesgo del conjunto de genes (puntuación GR). Las variables demográficas y clínicas, incluyendo CADI-3, la función retardada del injerto, el rechazo agudo a los 3 meses o antes, los anticuerpos contra HLA1 o HLA2, la raza del donante, la edad del donante, la raza del receptor, la edad del receptor, el estado del donante (vivo/fallecido) y la terapia de inducción, solos o junto con las puntuaciones de riesgo del conjunto de genes se ajustaron en el modelo de riesgos proporcionales de Cox del tiempo hasta la pérdida del injerto para el investigador si alguna de las variables demográficas o clínicas está asociada con la pérdida del injerto. A continuación, los pacientes se estratificaron en dos poblaciones según la puntuación de riesgo del conjunto de genes (puntuación GR) para el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Finalmente, se representó gráficamente la ROC dependiente del tiempo para la predicción de la pérdida del injerto dentro de los 2 o 3 años posteriores al trasplante y se calcularon las AUC.

Validación del conjunto de genes:

El conjunto de genes óptimo final también se validó en dos conjuntos de datos públicos independientes. Ambos conjuntos de datos públicos estaban en la plataforma Affymetrix GeneChip HU430plus2 (GSE213748, GSE259029). Los datos en bruto de estos conjuntos de datos públicos se procesaron en Affymetrix Expression Console de manera similar a lo que se ha descrito anteriormente para el conjunto de datos reivindicado. Se extrajeron los datos de expresión para cada uno de los genes en el conjunto de genes óptimo final. Las predicciones de los datos clínicos (pérdida del injerto después de la biopsia en cualquier momento para GSE21374 y aquellos con progresión/sin progresión según la puntuación CADI para GSE25902) se realizaron utilizando el modelo de regresión logística penalizado. Las puntuaciones de AUC para cada uno de estos 2 conjuntos de datos se calcularon de las curvas ROC para la especificidad de la predicción sobre la sensibilidad. El análisis del tiempo hasta la pérdida del injerto en el conjunto de datos 1 también se realizó (GSE21374) usando el mismo enfoque que para el conjunto de datos

GOCAR.

El conjunto de genes óptimo también se aplicó para predecir los individuos que han progresado y los que no han progresado usando el mismo enfoque descrito anteriormente. Los pacientes que tenían CADI-3 \leq 3 y demostraron un Δ CADI \geq 2 a los 12 meses se consideraron con progresión y aquellos que tenían Δ CADI \leq 1 se consideraron sin progresión. Se realizaron evaluaciones similares para aquellos con puntuación CADI a los 24 meses y también para los pacientes con CADI-3 \leq 2.

Ejemplo de qPCR

El ARN total se extrajo de muestras de biopsia de aloinjerto de 45 pacientes de cohortes independientes (18: CADI \geq 2 y 27:CADI $<$ 2) usando Allprep kit (QIAGEN-ALLprep kit, Valencia, CA, EE.UU.). El ADNc se sintetizará utilizando el kit AffinityScript RT con cebadores oligo dt (Agilent Inc. Santa Clara, CA). Ensayos de qPCR TaqMan para el conjunto de 13 genes, 3 genes de mantenimiento (ACTB, GAPDH y RPLP0) y 18s se compraron a ABI Life Technology (Grand Island, NY). Los experimentos de qPCR se realizaron en ADNc usando la mezcla universal TAQMAN y la reacción de PCR se controló y adquirió usando un sistema ABI7900HT. Las muestras se midieron por triplicado. Se generaron valores de CT para el conjunto de genes de predicción, así como los 3 genes de mantenimiento. El valor de Δ CT de cada gen se calculó restando el valor de CT promedio para los genes de mantenimiento del valor de CT de cada gen y luego se aplicó el modelo de ajuste de regresión logística penalizado a los valores de Δ CT para la predicción del CADI alto y bajo en 45 pacientes y, a continuación, se calculó el AUC como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 1: Población de pacientes y resultado del injerto.

En la cohorte se inscribieron 588 pacientes; en el estudio actual se incluyeron 204 pacientes según los criterios de inclusión. Cuando se cuantificó utilizando las puntuaciones CADI, el 60 % de las biopsias a los 12 meses tenían un CADI de 0-1, el 23 % de 2-4 y el 17 % superior a 4. Como cabía esperar, el CADI-12 se correlacionó negativamente con la TFGe a los 12 meses ($r = 0,35$; $p = 0,0004$) y el CADI-12 ≥ 2 se correlacionó con la supervivencia del injerto a 3 años (rango log $p = 0,007$); Un CADI-12 alto se definió como ≥ 2 en función de la asociación con la supervivencia del injerto 5, 10. La Tabla 1 resume los datos demográficos de los pacientes según el CADI. En la regresión multivariada, los factores clínicos asociados significativamente con un CADI-12 alto fueron la edad del donante, y del receptor).

La micromatriz se realizó en 159 m3_Bx, 101 de los cuales presentaron una biopsia de protocolo correspondiente a los 12 meses. Entre las razones de la falta de biopsia a los 12 meses se incluyeron pérdida del injerto ($n = 8$), muerte ($n = 1$), pérdidas para el seguimiento ($n = 9$), contraindicación/imposibilidad de obtener biopsia ($n = 40$). No hubo diferencias en las variables clínicas entre los 159 pacientes con micromatriz y los 101 con biopsias al año (Tabla 1). 86 pacientes disponían de un segundo núcleo de biopsia de m3 para anatomopatología, el 55 % tenía un CADI 0-1, el 33 % de 2-3 y el 12 % un CADI $>$ 3. Se diagnosticó rechazo agudo subclínico en 20/86 (23,5 %) m3_Bx [13-limitrofe, 3-IA, 1-IB, 3-IIA], mientras que en el 52 % se informó como normal.

Ejemplo 2: El fenotipo molecular intrainjerto depende del tiempo.

Los perfiles de expresión génica de m3_Bx se analizaron mediante análisis de correlación y Análisis de Enriquecimiento del Conjunto de Genes (GSEA) para comprender los mecanismos moleculares de FI/AT ($n = 159$). Se identificaron 1.316 genes que se correlacionaron significativamente con el CADI-3 (806 positivamente y 510 negativamente) y 1.056 genes con el CADI-12 (852 positivamente y 204 negativamente) en un punto de corte no ajustado $p < 0,05$. Solo 176 genes (13,2 %) se correlacionaron con CADI-3 y CADI-12. El enriquecimiento por Ontología Génica indicó que las transcripciones asociadas específicamente con CADI-3 de forma individual estaban relacionadas con la aloinmunidad, incluida la activación de linfocitos T; mientras que los genes implicados en la muerte celular programada/apoptosis y la adhesión celular se asociaron con CADI-12 solo. Las funciones biológicas se confirmaron aún más mediante el método GSEA en el que los datos de expresión génica en la categoría de GO se compararon entre pacientes con CADI alto (≥ 2) y bajo (< 2) a los 3 o 12 meses.

Ejemplo 3: El transcriptoma de 3 meses identifica los riñones en riesgo de daño crónico del aloinjerto

El transcriptoma obtenido de m3_Bx se analizó para identificar un conjunto de genes mínimo predictivo de CADI-12 (métodos complementarios). Inicialmente se identificó un conjunto de 169 genes que se correlacionaba específicamente con CADI-12 pero no con CADI-3. Estos 169 genes se redujeron a un conjunto de 85 genes después de excluir los genes de baja intensidad y ajustar los parámetros clínicos (Tabla 4). Las aplicaciones iterativas de los ajustes de regresión logística penalizados en los datos de expresión de estos 85 genes identificaron un conjunto de 13 genes óptimo que diferenciaba CADI-12 alto de CADI-12 bajo con un área bajo la curva (AUC) de 1 (Tabla 2). Esta fue más alta que el AUC para 13 conjuntos de genes seleccionados al azar de los 85 genes iniciales (AUC media $0,87 \pm 0,025$). El conjunto de genes se sometió a un método de validación cruzada triple con asignación aleatoria a conjuntos de entrenamiento y prueba (100 veces). La sensibilidad promedio, la especificidad y la precisión de la predicción para los conjuntos de prueba fueron del 95 %, 82 %, 86 %, respectivamente. El AUC

promedio para los 100 conjuntos de prueba [0,947 (IC del 95 %: 0,942-0,952)] fue mayor que cualquier AUC obtenida a partir de la predicción en grupos de pacientes con CADI alto y bajo asignados al azar con 10.000 iteraciones. Las AUC obtenidas para CADI-12 en diferentes puntos de corte, incluidos CADI-12 ≥ 3 o ≥ 4 , fueron 0,986 y 0,963 respectivamente, lo que confirma la robustez del conjunto de genes de la presente invención. La predicción por el conjunto de genes fue superior a las variables clínico-patológicas (AUC = 0,783) y la combinación de parámetros clínicos predictivos de CADI-12 alto no mejoró el rendimiento del conjunto de genes. Es importante destacar que el conjunto de genes también predijo con precisión la fibrosis según la puntuación de Banff (Ci + Ct) (AUC = 0,092). El rechazo subclínico estuvo presente en veinte m3_Bx y se asoció con un CADI-12 alto ($p = 0,0003$) y una puntuación BANFF (Ci + Ct) ($p = 0,002$). Excluyendo m3_Bx con rechazo o $i+t > 2$, no alteró la predicción de CADI-12 alto por el conjunto de genes desvelado en el presente documento (AUC = 1), mientras que los 13 genes predijeron mal la ACR (AUC = 0,743). Esto, junto con la capacidad de predecir Ci + Ct, demuestra que la inflamación no fue el impulsor predominante de su derivación. Por último, cuando se valida mediante qPCR en una cohorte GoCAR independiente con características demográficas similares a las del conjunto de entrenamiento (Tabla S4), el conjunto de genes diferenciaba con precisión un CADI-12 alto frente a bajo (AUC = 0,866).

Ejemplo 4: El transcriptoma predice la progresión del daño crónico del aloinjerto

A continuación, el conjunto de genes se aplicó para categorizar m3_Bx con fibrosis mínima o sin fibrosis en aquellos que desarrollarían o no fibrosis progresiva. De los 101 pacientes originales, se identificaron los aloinjertos con un CADI-3 ≤ 3 ($n = 68$) y se caracterizaron dos grupos en función del cambio en el CADI de 3 a 12 meses: (1) con progresión ($n = 1$) con $\Delta\text{CADI} \geq 2$; y (2) sin progresión ($n = 51$) con $\Delta\text{CADI} \leq 1$ (Tabla 1). La Tabla 5 compara las puntuaciones de anatomopatología de la biopsia a los 3 y 12 meses en aquellos con progresión frente a aquellos sin progresión. Aquellos con progresión tuvieron un CADI más alto a los 3 meses principalmente impulsado por la puntuación ci; sin embargo, el CADI-3 por sí solo no se pudo utilizar para diferenciar aquellos con progresión de los de sin progresión. Los parámetros clínicos también fueron malos predictores de la progresión (AUC = 0,642). El conjunto de genes desvelado identificó con precisión a aquellos con progresión-CADI de los sin progresión ($\Delta\text{CADI} \geq 2$) tanto a los 12 meses (AUC 0,984) como a los 24 meses (AUC 0,859). Además, predijo la progresión de CADI a los 12 y 24 meses igualmente bien cuando se analizaron aloinjertos prístinos con CADI-3 ≤ 2 (AUC = 1 y 0,84, respectivamente). Estos hallazgos son de importancia clínica, ya que aquellos con progresión tuvieron una peor supervivencia del injerto que los sin progresión a los 36 meses de seguimiento (Gehan-Breslow-Wilcoxon $p = 0,01$; rango logarítmico $p = 0,06$;

Ejemplo 5: La firma del transcriptoma predice la pérdida temprana del aloinjerto

A continuación, se generaron modelos de Cox con el conjunto de genes utilizado en la presente invención y las variables clínicas para predecir la pérdida de injerto censurada por muerte en la cohorte desvelada (pérdida de injerto $n = 11$). Tres componentes principales (P4, P6 y P7) de los datos de expresión de 13 genes se asociaron significativamente con la pérdida del injerto en el modelo de riesgos proporcionales de Cox ($p < 0,05$) (Tabla S5) y se utilizaron para derivar la "puntuación de riesgo del conjunto de genes" (puntuación GR) (pérdida del injerto HR 2,719, IC del 95 %: 1,60-4,63). Los pacientes se estratificaron en dos grupos de igual tamaño según esta puntuación GR y las puntuaciones más altas se asociaron significativamente con la pérdida del injerto (rango logarítmico $p < 0,002$). Usando la puntuación GR, las AUC para la pérdida del injerto dependiente del tiempo en los 2 y 3 años posteriores al trasplante fueron 0,863 y 0,849, respectivamente. Entre las variables clínicas, solo la función retardada del injerto se asoció significativamente con la pérdida del injerto (Tabla 6). Sin embargo, la combinación de conjunto de genes con función de injerto retardada no mejoró la predicción.

Ejemplo 6: Validación del conjunto de genes predictivos.

Para confirmar la utilidad del conjunto de 13 genes en diversos entornos, se analizaron dos conjuntos de datos independientes disponibles públicamente utilizando los criterios de valoración de pérdida del injerto y CADI como indicadores de lesión crónica del aloinjerto (Tabla 9). El conjunto de genes predijo con precisión el criterio de valoración relativo para cada uno de los conjuntos de datos, superando el AUC informado por los estudios originales. El análisis de supervivencia para el conjunto de datos 1 usando el conjunto de genes usado en la presente invención mostró diferencias significativas entre los grupos estratificados de alto y bajo riesgo de pérdida del injerto ($p = 2,1 \times 10^{-9}$); Las AUC para la pérdida del injerto a 1 y 2 años después de la biopsia fueron 0,865 y 0,807, respectivamente. Estos datos demuestran que este conjunto de 13 genes se puede aplicar en poblaciones para la predicción de resultados diversos pero clínicamente importantes, incluida la supervivencia del aloinjerto.

Ejemplo 7: Conjunto de 13 firmas génicas según la presente invención

KLHL13, KAAG1, MET, SPRY4, SERINC5, CHCHD10, FJX1, WNT9A, RNF149, ST5, TGIF1, RXRA, ASB15. Los nombres reconocidos en la técnica de estos genes se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1: Características demográficas y clínicas (CADI-12 alto y bajo; CADI-con progresión y sin progresión)

Características	159 pacientes en micromatriz Media±SD (%)	101 pacientes con CADI-12 Media±SD (%)	Valor p*	CADI alto n=40 Media±SD (%)	CADI bajo n=69 Media±SD (%)	Valor p*	17 Con progresión ΔCADI±2 Media±SD (%)	53 Sin progresión ΔCADI<-2 Media±SD (%)	Valor p*
Edad del receptor	48,84 ± 13,27	46,88 ± 12,38	0,24	48,7 ± 13,32	47,38 ± 13,09	0,96	48,88 ± 13,34	46,88 ± 12,78	0,28
Sexo del receptor-Mujer	47 (29,55)	38 (37,76)	0,27	16 (40,00)	15 (21,74)	0,09	8 (47,06)	10 (18,87)	0,27
Raza del receptor			0,23			0,08			0,28
Blanca	92 (57,86)	86 (85,15)		23 (57,5)	43 (62,32)		8 (47,06)	39 (73,17)	
Afroamericana	37 (23,27)	15 (14,85)		6 (15,0)	9 (12,90)		4 (23,53)	5 (9,26)	
Hispana	14 (8,82)	7 (6,93)		4 (10)	3 (4,35)		2 (11,76)	2 (3,77)	
Otra/Sin notificar	16 (10,02)	13 (12,87)		7 (17,5)	8 (11,62)		3 (17,65)	5 (9,38)	
Diagnóstico ESRD del receptor			0,22			0,03			0,28
Nefropatía diabética	57 (35,85)	33 (32,67)		12 (30,0)	21 (30,43)		4 (23,53)	17 (32,13)	
Hipertensión	24 (15,09)	17 (16,83)		7 (17,5)	10 (14,49)		4 (23,53)	8 (15,09)	
Glomerulonefritis	22 (13,81)	22 (21,78)		7 (17,5)	15 (21,74)		3 (17,65)	10 (18,87)	
Riñón poliquístico	14 (8,82)	13 (12,87)		5 (12,5)	8 (11,62)		3 (17,65)	7 (13,21)	
Otros	36 (22,64)	16 (15,84)		9 (22,5)	7 (10,14)		3 (17,65)	9 (17,02)	
Trasplante renal previo (%)	3 (1,88)	2 (1,98)	1,00	2 (5)	0 (0)	0,13	1 (5,88)	1 (1,89)	0,45
Edad del donante	41,13 ± 16,20	40,78 ± 16,80	0,87	41,08 ± 17,91	36,79 ± 14,75	0,008	43,88 ± 17,80	37,47 ± 17,01	0,28
Sexo del receptor-Mujer	77 (48,43)	68 (67,34)	0,20	17 (42,50)	29 (42,17)	0,69	7 (40,61)	24 (45,28)	0,27
Raza del receptor			0,64			1,00			0,89
Blanca	121 (75,6)	86 (85,15)		31 (77,5)	49 (70,87)		13 (75,88)	42 (79,43)	
Afroamericana	17 (10,63)	8 (7,92)		4 (10,0)	4 (5,79)		2 (11,76)	3 (5,77)	
Hispana	12 (7,54)	5 (4,95)		1 (2,5)	4 (5,79)		1 (5,88)	3 (5,77)	
Otra/Sin notificar	9 (5,60)	8 (7,92)		4 (10,0)	7 (10,14)		1 (5,88)	3 (5,77)	
Estado del donante	94/65	58/43	0,79	23/17	33/36	0,42	10/7	22/31	1,00

Fallecido/Vivo									
Creatinina en suero a 3 meses	1,38±0,23	1,32±0,28	0,28	1,32±0,2947	1,32±0,228	0,96	1,36±0,30	1,25±0,30	0,00
CADI a 3 meses Media±SD	1,83±1,78	1,86±1,79		2,57±2,08	1,08±1,38	<0,001	1,39±1,18	0,88±0,78	0,03
-Mediana (IQR)	1 (0-0)	1 (0-0)		2 (0-4)	1 (0-0)		1,5 (0-6,25)	1 (0-3,40)	
Tiempo de isquemia fría (h)*	14,64±6,78	15,81±6,74	0,48	15,87±7,13	12,39±5,11	0,05	16,30±6,89	12,78±5,17	0,17
Función retardada del injerto*	21 (13,21)	9 (8,91)	0,32	7 (17,5)	2 (2,86)	0,009	4 (23,53)	4 (7,53)	0,17
Anticuerpos Anti-HLA**	33 (20,75)	25 (24,76)	0,25	11 (27,5)	14 (20,14)	0,63	3 (17,65)	8 (15,09)	1,00
Positivos para DSA	11 (7,0)	7 (6,94)		3 (7,5)	4 (5,79)		3 (17,65)	4 (7,53)	
Clase I	3 (1,88)	6 (5,98)		3 (7,5)	3 (4,35)		3 (17,65)	2 (3,77)	
Clase II	6 (3,87)	2 (1,92)		0 (0,0)	2 (2,86)		0 (0,0)	3 (5,77)	
No positivos para DSA	25 (15,7)	20 (19,77)		8 (20,0)	12 (17,14)		0 (0,0)	6 (11,26)	
Clase I	25 (15,65)	20 (19,77)		8 (20,0)	12 (17,14)		0 (0,0)	6 (11,26)	
Clase II	0 (0,0)	7 (6,94)		3 (7,5)	4 (5,79)		0 (0,0)	4 (7,53)	
Terapia de inducción			0,87			0,47			0,24
Timoglobulina	46 (28,91)	26 (25,74)		12 (30,0)	14 (20,14)		5 (29,41)	9 (17,02)	
Terapia con auto-CD25	53 (32,70)	38 (37,63)		17 (42,5)	21 (30,43)		9 (52,94)	19 (35,71)	
Campath	9 (5,66)	8 (7,92)		2 (5,0)	6 (8,57)		1 (5,88)	6 (11,26)	
Ninguna	49 (30,81)	29 (28,71)		9 (22,5)	20 (28,97)		2 (11,76)	17 (32,13)	
Inmunosupresión de mantenimiento a 12 meses			0,22			0,68			0,73
MMF, CNI, esteroides	139 (87,40)	90 (89,11)		37 (92,5)	33 (47,79)		16 (94,12)	41 (77,36)	
MMF, CNI	12 (7,54)	8 (7,92)		2 (5,0)	6 (8,57)		1 (5,88)	7 (13,21)	
Otros	8 (5,06)	3 (2,97)		1 (2,5)	2 (2,86)		0 (0,0)	1 (1,89)	
Inyecciones agudas a 1 año	22 (13,84)	22 (21,78)	NA	18 (45,0)	4 (5,79)	<0,01	7 (40,61)	5 (9,26)	<0,01

Leyenda: CADI: índice del daño crónico al injerto a 12 meses; MFI: intensidad media de fluorescencia; MMF: micofenolato de mofetilo; CNI: inhibidores de la calcineurina; DSA: anticuerpos específicos del donante; *Solo donantes fallecidos; **: 94/101 pacientes con anticuerpos medidos *Valor P determinado mediante la prueba de Mann-Whitney (comparaciones no paramétricas) o prueba t no pareada

Tabla 2: Análisis multivariado - Covariables clínicas predictivas de la puntuación CADI a los 12 meses ≥ 2

Estimaciones del cociente de posibilidades				
Efecto	Estimación puntual	Límites de confianza de Wald del 95 %		Valor p*
Edad del donante	1,062	1,025	1,100	0,0007
Estado del donante (DF*frente a DV**)	4,292	1,311	14,054	0,0161
ACR (antes de 3 meses) (Sí frente a No)	3,014	1,023	8,876	0,0453
Raza del receptor (no caucásico frente a caucásico)	1,709	0,591	4,947	0,3227
Sexo del receptor (mujer frente a varón)	6,653	1,900	23,294	0,0030
Terapia de inducción***				
Depleción de linfocitos	1,445	0,408	5,111	0,8515
No depleción de linfocitos	2,550	0,660	9,855	0,1915
Anticuerpos anti-HLA (No frente a sí)	0,358	0,092	1,399	0,1397

*Valor p - Chi-cuadrado de Wald, *DF - Donante fallecido, **DV - Donante vivo

5 ***La categoría de terapia de inducción compara la terapia de inducción con depleción de linfocitos y sin depleción de linfocitos con la ausencia de terapia de inducción

Tabla 3: Conjunto de predicción de 13 genes

ID sonda	Símbolo	Descripción del gen	Citobanda	Registro del ARNm	Corr. CADI	Valor p
3326828	FX1	Caja 1 de cuatro unidos (Drosophila)	11p13	NM_014344	0,384142	7,31E-05
4019160	KLHL13	13 de tipo Kelch (Drosophila)	Xq23-q24	NM_001159302	0,380008	8,87E-05
3964887	CHCHD10	Dominio de hélice superenrollada-hélice superenrollada que contiene 10	22q11.23	NM_213720	0,338888	0,000538
2364449	SRINC5	Incorporador 5 de serina	5q14.1	NM_001174672	0,330535	0,000736
9020343	MET	Protoncogén met (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos)	7q31	NM_001127500	0,325015	0,000912
2567583	RNF149	Proteína 149 del dedo en anillo	2q31.2	NM_173647	0,304022	0,001996
2879105	SPRY4	Homólogo 4 de Sprouty	5q31.3	NM_030964	0,303068	0,003
2898441	KLAG1	Antígeno 1 asociado renal	6p22.1	NM_181337	0,264688	0,007476
3776504	TGFB1	Homeobox 1 del factor inducido por TGFB	16p11.3	NM_170695	0,248915	0,012071
2438332	WNT9A	Miembro 9A de la familia del sitio de integración de MMTV de tipo wingless	1q42	NM_003395	0,237215	0,016917
3361973	ST5	Supresión de la tumorigenicidad 5	11p15	NM_005418	0,231432	0,019879
3071096	ASS13	Repetición de ankirina y caja SOCS que contiene 15	7q31.33	NM_080978	-0,2548	0,010128
3183339	RXR α	Receptor retinoide X, alfa	9q34.3	NM_002957	-0,20533	0,001904

10

Tabla 4: El conjunto de 85 genes centrales

ES 2 824 108 T3

ID sonda	Símbolo del gen	Descripción del gen	Citobanda	Reg. ARNm	Corr. CADI	Valor p.	Pendiente
2753842	PROM1	Prominina 1	4p15.32	NM_00114	0,358	0,000	0,138
3040518	MACC1	Asociado a metástasis en el cáncer de colon 1	7p21.1	NM_18276	0,407	0,000	0,109
2583465	ITGB6	Integrina, beta 6	2q24.2	NM_00088	0,340	0,000	0,102
2974413	MOXD1	Monooxigenasa, de tipo DBH 1	6q23.1-123NM	01552	0,316	0,001	0,100
2868265	LIX1	Homólogo de Lix1 (pollo)	5q15	NM_15323	0,329	0,001	0,098
2659979	CX3CR1	Receptor 1 de quimioquina (motivo C-X3-C)	3p21.3-p21NM	00117	0,278	0,005	0,095
2721959	SLC34A2	Familia del transportador de solutos 34 (fosfato sódico), miembro 2	4p15.3-p15NM	00117	0,354	0,000	0,091
3167110	ANXA2P2	Pseudogén 2 de anexina A2	9p13	NR_00557	0,335	0,001	0,084
3596147	GCNT3	Glucosaminil (N-acetil) transferasa 3, tipo mucina	15q21.3	NM_00475	0,369	0,000	0,083
3129065	CLU	Clusterina	8p21-p12	NM_00183	0,347	0,000	0,080
2515918	ATAD3C	Familia de ATPasa, dominio AAA que contiene 3C	1p36.33	NM_00109	0,268	0,007	0,080
3020192	TES	Transcripción derivada del testículo (3 dominios LIM)	7q31.2	NM_01564	0,343	0,000	0,080
4019160	KELCH13	13 de tipo Kelch (Drosophila)	Xq23-q24	NM_00116	0,380	0,000	0,072
2602770	DNER	Contiene repetición de EGF de tipo delta/nocht	2q36.3	NM_13507	0,327	0,001	0,066
3471753	C12orf47	Marco de lectura abierto 47 del cromosoma 12	12q24.12	NR_015404	0,214	0,032	0,066
2898441	KAAG1	Antígeno 1 asociado renal	6p22.1	NM_18133	0,265	0,007	0,062
2486927	ARHGAP25	Proteína 25 activadora de Rho GTPasa	2p13.3	NM_01468	0,300	0,002	0,062
3415320	KRT7	Queratina 7	12q12-q13	NM_00555	0,251	0,011	0,061
2787902	GYPE	Glicoforina E (Grupo sanguíneo MNS)	4q31.1	NM_19868	0,281	0,004	0,059
3020343	MET	Protooncogén met (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos)	7q31	NM_00112	0,325	0,001	0,057
2414958	TACSTD2	Transductor 2 de la señal de calcio asociada a tumores	1p32-p33	NM_00235	0,240	0,015	0,057
3405587	GPRCSA	Receptor acoplado a proteína G, familia C, grupo 5, miembro A	12p13-p17	NM_00397	0,277	0,005	0,057
2344838	CYR61	Inductor angiogénico, rico en cisteína, 61	1p31-p22	NM_00155	0,349	0,000	0,055
3950061	RAC2	Sustrato 2 de la toxina botulínica C3 relacionada con ras (familia rho, GTP bi pequeña)	22q13.1	NM_00267	0,235	0,018	0,055
2672140	UTF	Lactotransferrina	3p21.31	NM_00234	0,287	0,004	0,055
2879105	SPRY4	Homólogo 4 Sprouty (Drosophila)	5q31.3	NM_00096	0,304	0,002	0,053
2654449	SERNCS	Incorporador 5 de serina	5q14.1	NM_00117	0,331	0,001	0,049
3168938	POLR1E	Polipéptido E de la polimerasa (ARN) I, 53 kDa	9p13.2	NM_02249	0,250	0,012	0,047
2556142	LIX1L	De tipo homólogo Lix1 (ratón)	1q21.1	NM_15371	0,257	0,009	0,047
3464860	DUSP6	Fosfatasa 6 de especificidad doble	12q27-q28	NM_00194	0,382	0,000	0,047
3108489	LAPTM4B	Proteína lisosomal transmembrana 4 beta	8q22.1	NM_01840	0,316	0,001	0,047
2574982	RNPEP	Arginil aminopeptidasa (Aminopeptidasa B)	1q32	NM_02021	0,286	0,004	0,044

3796620 DLGAP1	Proteína 1 asociada al homólogo grande (Drosophila), discos	18p11.3	NM_00474	GNM_00474	0,363	0,000	0,044
3662041 OGFOD1	Dominio c de oxigenasa dependiente de hierro y 2-oxoglutarato, contiene 1	16q12.2	NM_01823	GNM_01823	0,284	0,004	0,043
2323899 UBXN10	Proteína 10 dominio UBX	1p36.12	NM_15237	GNM_15237	0,226	0,023	0,043
3332919 TMEM216	Proteína 216 transmembrana	11q13.1	NM_01649	GNM_01649	0,244	0,014	0,043
3554887 CHCHD10	Dominio de hélice superenrollada-hélice superenrollada que contiene 10	22q13.23	NM_21372	GNM_21372	0,339	0,001	0,043
3850445 CDKN2D	Inhibidor 2D de quinasas dependiente de ciclina (p19, inhibe CDK4)	19p13	NM_00180	GNM_00180	0,263	0,008	0,042
3232349 PFKFB	Fosfofructoquinasa, plaquetas	10p15.3-p11NM_00262		GNM_00262	0,247	0,013	0,041
2881187 CSF1R	Receptor del factor 1 estimulante de las colonias	5q33-q35	NM_00521	GNM_00521	0,240	0,016	0,041
3820443 HANP1	Molécula 1 de adhesión intercelular	19p13.3-p11NM_00020		GNM_00020	0,245	0,013	0,040
3326826 FJK1	Caja 1 de cuatro unidos (Drosophila)	11p13	NM_01434	GNM_01434	0,384	0,000	0,040
2825629 TNFAIP8	Factor de necrosis tumoral, proteína 8 inducida por alfa	5q23.1	NM_01435	GNM_01435	0,294	0,003	0,040
3868998 RRG7	Secuencia del grupo 7 de células citolíticas naturales	19q13.41	NM_00560	GNM_00560	0,243	0,014	0,039
3726154 ITGA3	Integrina, alfa 3 (antígeno CD49C, subunidad alfa 3 del receptor VLA-3)	17q21.33	NM_00220	GNM_00220	0,263	0,008	0,039
3024025 MEST	Homólogo del transcrito específico del mesodermo (ratón)	7q32	NM_00240	GNM_00240	0,291	0,003	0,038
2459952 WNT9A	Familia del sitio de integración de MMTV de tipo wingless, miembro 9A	1q42	NM_00339	GNM_00339	0,237	0,017	0,037
3872335 ZNF416	Proteína 416 del dedo de cinc	19q13.4	NM_01787	GNM_01787	0,283	0,004	0,037
2859437 BFN2A1	Butirofilina, subfamilia 2, miembro A1	6p22.1	NM_07847	GNM_07847	0,255	0,010	0,037
3734648 SLC16A5	Familia 16 del transportador de solutos, miembro 5 (transportador de ácido monocarboxílico)	17q25.1	NM_00469	GNM_00469	0,279	0,005	0,037
3605395 ADAMTS3	De tipo ADAMTS 3	15q25.2	NM_20751	GNM_20751	0,320	0,001	0,036
2435218 TDRKH	Contiene el dominio tudor y KH	1q21	NM_00108	GNM_00108	0,272	0,006	0,036
2876361 PITX1	Homeodominio 1 de tipo apareado	5q31	NM_00265	GNM_00265	0,246	0,013	0,036
2621881 P4HFM	Profilin-4-hidroxilasa, transmembrana (retículo endoplasmático)	3p21.31	NM_17793	GNM_17793	0,293	0,003	0,032
2407985 HEYL	Peludo/potenciador of-split relacionado con similar al motivo YRPW	1p34.3	NM_01457	GNM_01457	0,240	0,016	0,031
3270270 PTPRE	Proteína tirosina fosfatasa, de tipo receptor, E	10q26	NM_00650	GNM_00650	0,255	0,010	0,031
3738471 RAC3	Sustrato 3 de la toxina botulínica C3 relacionada con ras (familia rho, GTP bi pequeña)	17q25.3	NM_00505	GNM_00505	0,246	0,013	0,030
3028217 ---	---	---	AK3G3101	GNM_003101	0,243	0,014	0,030
3888283 SLC9A8	Familia 9 del transportador de solutos (intercambiador de sodio/hidrógeno), miembro 8	20q13.13	NM_01526	GNM_01526	0,299	0,002	0,030
2567583 RNF149	Proteína 149 de dedo de cinc	2q11.2	NM_17364	GNM_17364	0,304	0,002	0,030
3056264 ABHD11	Dominio abhidroxilasa que contiene 11	7q11.23	NR_026912	GNM_026912	0,251	0,011	0,029
3261009 KAZALD1	Dominio 1 del inhibidor de la serina peptidasa de tipo Kazal	10q24.31	NM_03092	GNM_03092	0,251	0,011	0,029
2369484 TOR3A	Familia 8 de torcina, miembro A	1q25.2	NM_02237	GNM_02237	0,279	0,005	0,028
2931391 MTHFD1L	Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa (dependiente de NADP+)	6q25.1	NM_01544	GNM_01544	0,299	0,002	0,028
3361971 ST5	Supresión de tumorigenicidad, 5	11p15	NM_00541	GNM_00541	0,231	0,020	0,028
3623717 FLJ10038	Proteína hipotética FLJ10038	15q21.2	NR_026891	GNM_026891	0,277	0,005	0,028
2361342 SEMA4A	Dominio sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio transmembrana	1q22	NM_02236	GNM_02236	0,229	0,021	0,026
3051655 VOPF1	Proteína 1 de supervivencia, vesicular, sobreexpresada en cáncer	7p11.2	NM_03079	GNM_03079	0,229	0,021	0,025
3776504 TGFB1	Homeobox 1 del factor inducido por TGFβ	18p11.3	NM_17969	GNM_17969	0,249	0,012	0,025
2692319 ADCY5	Adenilato ciclasa 5	3q13.2-q21NM_18335		GNM_18335	0,200	0,044	0,025
2933392 SYN2	Sinaptojanina 2	6q25.3	NM_00589	GNM_00589	0,263	0,004	0,024
3185593 BSNRY	Contiene caja B y dominio SPRY	9q32	NM_01768	GNM_01768	0,279	0,005	0,023
3865998 PNMA1	1 de tipo PNMA	19q13.32	NM_01821	GNM_01821	0,294	0,019	0,023
2359885 SLC27A3	Familia 27 de transportador de solutos (transportador de ácidos grasos), miembro 3	1q21.3	NM_02433	GNM_02433	0,237	0,017	0,022
2714132 PDE6B	Fosfodiesterasa 6B, específico de cGMP, rod, beta	4p16.3	NM_00028	GNM_00028	0,272	0,006	0,022
3224087 TLL11	Familia de tipo tubulina tirosina ligasa, miembro 11	9q33.2	NM_00113	GNM_00113	0,248	0,012	0,021
3431852 SH2B3	Proteína 3 del adaptador de SH2B	12q24	NM_00547	GNM_00547	0,307	0,002	0,018
3199339 RXRA	Receptor de retinoide X, alfa	9q34.3	NM_00295	GNM_00295	-0,305	0,002	-0,025
3645901 NAT15	N-acetiltransferasa 15 (relacionada con GCN5, putativo)	16p13.3	NM_02484	GNM_02484	-0,298	0,002	-0,040
2942578 CDC90A	Dominio superenrollado que contiene 90A	6p24.3-p23NM_00103		GNM_00103	-0,268	0,007	-0,044
3907507 C2orf165	Marco de lectura abierta 165 del cromosoma 20	20q13.12	NM_08060	GNM_08060	-0,219	0,028	-0,049
3305801 SORCS1	Receptor 1 que contiene el dominio VPS10 relacionada con sortilina	10q23-q25	NM_05291	GNM_05291	-0,272	0,006	-0,060
3021896 ASB15	Contiene repetición de ankirina y caja SOCS 15	7q11.31	NM_08092	GNM_08092	-0,255	0,010	-0,102
3394412 THY1	Antígeno de superficie celular Thy-1	11q22.3-q22NM_00628		GNM_00628	-0,239	0,016	-0,112
3635903 LOC388152	LOC388152 hipotético	15q25.2	BC054509	GNM_054509	-0,212	0,053	-0,136

Tabla 5: Comparaciones de CADI entre con progresión/sin progresión

Parámetro	3 meses			12 meses		
	Con progresión Media±SD	Sin progresión Media±SD	Valor p*	Con progresión Media±SD	Sin progresión Media±SD	Valor p*
CADI	1,53±1,18	0,86±0,98	0,03	5,65±2,47	0,96±0,98	<0,0001
Puntuación ct	0,56±0,51	0,41±0,50	0,29	1,33±0,87	0,52±0,50	<0,0001
Puntuación cv	0,0±0,0	0,02±0,14	0,64	0,0±0,0	0,0±0,0	NA
Puntuación ci	0,44±0,63	0,10±0,30	<0,01	1,71±1,11	0,16±0,37	<0,0001
Puntuación i	0,06±0,25	0,08±0,34	0,98	1,71±0,92	0,06±0,23	<0,0001
Puntuación mm	0,0±0,0	0,02±0,14	0,61	0,25±0,68	0,0±0,0	0,01
Puntuación g	0,28±0,73	0,16±0,58	0,47	0,06±0,25	0,12±0,52	1,00

*Prueba de Mann-Whitney

Tabla-6: Características clínicas y demográficas basales para las cohortes de pacientes GoCAR

Características:	Pacientes de micromatriz (n = 101) Media ± SD (%)	Pacientes de RT-PCR (n = 45) Media ± SD (%)	Valor p*
Edad del receptor	46,90±12,38	46,81±11,52	0,69
Raza del receptor			0,96
Caucásica	66 (65,35)	33 (73,33)	
Afroamericana	15 (14,85)	3 (6,67)	
Otros	20 (19,80)	9 (20,0)	
Diagnóstico ESRD del receptor			0,63
Nefropatía diabética	33 (32,67)	10 (22,22)	
Hipertensión	17 (16,83)	6 (13,33)	
Glomerulonefritis	22 (21,78)	15 (33,33)	
Riñón poliquístico	13 (12,87)	5 (11,11)	
Otros	16 (15,84)	9 (20,00)	
Edad del donante	40,73±16,80	44,87±14,68	0,16
Raza del donante			0,72
Caucásica	80 (79,21)	42 (93,33)	
No caucásica	21 (20,79)	3 (6,67)	
h/o Función retardada del injerto	9 (8,91)	5 (11,11)	0,54
Anticuerpos anti-HLA**	19 (20,21)	19 (42,22)	<0,01
Clase I	19 (20,21)	19 (42,22)	
Clase II	4 (3,90)	12 (26,67)	
TFGe-creatinina a 3 meses	62,53±17,90	59,27±18,91	0,37
Rechazo agudo a 3 meses*	20 (22,7)	11 (28,94)	0,36
CADI-12 alto/bajo	40/61	18/27	1,00
CADI-12 alto			0,34
- <u>Media ±SD</u>	4,58±2,25	4,00±2,09	
- Mediana (IQR)	4 (3,0-5,0)	3 (2,75-5,0)	
CADI-12 bajo			0,96
- <u>Media ±SD</u>	0,48±0,50	0,48±0,51	
- Mediana (IQR)	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-1,0)	

*Valor p por prueba T no apareada (o no paramétrica) y, Chi-cuadrado/prueba exacta de Fisher. **94/101 y 38/45 pacientes con anticuerpos HLA medidos.

5

* 86/101 y 40/45 pacientes con biopsia a 3 meses informada para histología

Tabla 7: Asociación de 10 componentes principales de 13 conjuntos de genes con pérdida de injerto en el modelo de riesgos proporcionales de Cox

10

PC	Coef.	Exp. (coef.)	se(coef.)	z	p
PC1	-0,396	6,73E-01	32,66	-0,0121	0,99
PC2	-6,845	1,06E-03	7	-0,9778	0,33
PC3	-0,931	3,94E-01	7,96	-0,117	0,91
PC4	-14,933	3,27E-07	5,03	-2,9692	0,003 *
PC5	1,366	3,92E+00	3,87	0,3532	0,72
PC6	12,233	2,05E+05	5,14	2,38	0,017 *
PC7	9,201	9,90E+03	4,44	2,0735	0,038 *
PC8	0,824	2,28E+00	3,8	0,2166	0,83
PC9	-2,674	6,90E-02	5,18	-0,5159	0,61
PC10	-2,771	6,26E-02	4,02	-0,6889	0,49

Prueba de razón de probabilidades = 20,7 en 10 df p = 0,023 n = 155, número de acontecimientos = 11

5 **Tabla 8:** Asociación de variables demográficas o clínicas con pérdida del injerto en el modelo de riesgos proporcionales de Cox

Variable	Coef.	Exp. (coef.)	SE (coef.)	Z	P
ACR_M3 y menos	2,5635	1,30E+01	1,31E+00	1,96E+00	0,05
Función retardada del injerto	1,8058	6,08E+00	8,64E-01	2,09E+00	0,037 *
M3 CADI	-0,196	8,22E-01	2,84E-01	-6,89E-01	0,49
Estado del donante (vivo frente a fallecido)	1,5616	4,77E+00	1,39E+00	1,12E+00	0,26
HLA1 n	19,1431	2,06E+08	1,78E+04	1,08E-03	1
HLA1 ndsa	0,9569	2,60E+00	2,18E+04	4,39E-05	1
HLA2 n	15,5608	5,73E+06	7,23E+04	2,15E-04	1
HLA2 ndsa	34,0887	6,38E+14	7,34E+04	4,64E-04	1
Tipo de inducción LND	0,0239	1,02E+00	1,37E+00	1,74E-02	0,99
Tipo de inducción ninguna	-0,5606	5,71E-01	1,78E+00	-3,15E-01	0,75
Raza del donante: Negra/Afroamericana	-0,5692	5,66E-01	2,15E+00	-2,65E-01	0,79
Raza del donante: Hispana	-19,7123	2,75E-09	1,59E+04	-1,24E-03	1
Raza del donante: Islas del pacífico	-2,7581	6,34E-02	1,19E+05	-2,31E-05	1
Raza del donante: Blanca/Caucásica	-0,1417	8,68E-01	1,78E+00	-7,98E-02	0,94
Raza: Negra/Afroamericana	-0,0731	9,29E-01	2,14E+00	-3,42E-02	0,97
Raza: Hispana	0,8838	2,42E+00	2,50E+00	3,54E-01	0,72
Raza: Islas del pacífico	-16,8824	4,66E-08	1,12E+05	-1,51E-04	1
Raza: Blanca/Caucásica	-1,4232	2,41E-01	1,58E+00	-9,00E-01	0,37
Edad del donante	0,0189	1,02E+00	3,46E-02	5,45E-01	0,59
Edad	0,0238	1,02E+00	4,54E-02	5,25E-01	0,6

10 *Anticuerpo HLA; dsa: antígeno específico del donante, referencia; ndsa: no anticuerpos dsa; n: sin anticuerpos

Tipo de inducción: DV; Depleción de linfocitos, referencia; LND; Sin depleción de linfocitos; Ninguna: Sin inducción

*La referencia para la raza: Asiática

15

Prueba de razón de probabilidades = 32,1 en 24 df p = 0,123 n = 135, número de acontecimientos = 10

Tabla 9: Validación del conjunto de genes GoCAR en otras cohortes de trasplante de riñón.

Conjunto de datos	Genechip/ Plataforma	Tamaño de la muestra	Resultado	AUC	Ref.
Conjunto de datos 1	Affymetrix U133 más 2.0	282	Pérdida de injerto	0,83	9
Conjunto de datos 2	Affymetrix U133 más 2.0	24	CADI	0,972	10

REFERENCIAS

- 5 1. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2004;4:378-83.
- 10 2. Wolfe RA, Roys EC, Merion RM. Trends in organ donation and transplantation in the United States, 1999-2008. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2010;10:961-72.
3. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349:2326-33.
- 15 4. Yilmaz S, McLaughlin K, Paavonen T, *et al.* Clinical predictors of renal allograft histopathology: a comparative study of single-lesion histology versus a composite, quantitative scoring system. *Transplantation* 2007;83:671-6.
5. Yilmaz S, Tomlanovich S, Mathew T, *et al.* Protocol core needle biopsy and histologic Chronic Allograft Damage Index (CADI) as surrogate end point for long-term graft survival in multicenter studies. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 2003;14:773-9.
- 20 6. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, *et al.* Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2008;8:753-60.
7. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic acids research* 2003;31:e15.
- 25 8. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* 2007;8:118-27.
9. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102:15545-50.
- 30 10. Einecke G, Reeve J, Sis B, *et al.* A molecular classifier for predicting future graft loss in late kidney transplant biopsies. *The Journal of clinical investigation* 2010;120:1862-72.
11. Naesens M, Khatri P, Li L, *et al.* Progressive histological damage in renal allografts is associated with expression of innate and adaptive immunity genes. *Kidney international* 2011;80:1364-76.
12. Park WD, Griffin MD, Cornell LD, Cosio FG, Stegall MD. Fibrosis with inflammation at one year predicts transplant functional decline. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1987-97.
- 35 13. Isoniemi H, Taskinen E, Hayry P. Histological chronic allograft damage index accurately predicts chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1994;58:1195-8.
14. Cosio FG, Grande JP, Wadei H, Larson TS, Griffin MD, Stegall MD. Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2005;5:2464-72.
- 40 15. Stegall MD, Park WD, Larson TS, *et al.* The histology of solitary renal allografts at 1 and 5 years after transplantation. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2011;11:698-707.
16. Mannon RB, Matas AJ, Grande J, *et al.* Inflammation in areas of tubular atrophy in kidney allograft biopsies: a potent predictor of allograft failure. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2010;10:2066-73.
- 45 17. Hayry P, Paavonen T, Taskinen E, *et al.* Protocol core needle biopsy and histological chronic allograft damage index as surrogate endpoint for Long-Term graft survival. *Transplant Proc* 2004;36:89-91.
18. Seron D, Moreso F, Bover J, *et al.* Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997;51:310-6.
- 50 19. Seron D, Moreso F, Fulladosa X, Hueso M, Carrera M, Grinyo JM. Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies. *Kidney Int* 2002;61:727-33.
20. Nankivell BJ, Fenton-Lee CA, Kuypers DR, *et al.* Effect of histological damage on long-term kidney transplant outcome. *Transplantation* 2001;71:515-23.

21. Furness PN, Taub N, Assmann KJ, *et al.* International variation in histologic grading is large, and persistent feedback does not improve reproducibility. *Am J Surg Pathol* 2003;27:805-10.
22. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, *et al.* Identifying specific causes of kidney allograft loss. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2009;9:527-35.
23. Chapman JR. Do protocol transplant biopsies improve kidney transplant outcomes? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012;21:580-6.
24. Shishido S, Asanuma H, Nakai H, *et al.* The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1046-52.
25. Kurtkoti J, Sakhuja V, Sud K, *et al.* The utility of 1- and 3-month protocol biopsies on renal allograft function: a randomized controlled study. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2008;8:317-23.
26. Rush D, Nickerson P, Gough J, *et al.* Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:2129-34.
27. Rush D, Arlen D, Boucher A, *et al.* Lack of benefit of early protocol biopsies in renal transplant patients receiving TAC and MMF: a randomized study. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2007;7:2538-45.
28. Scherer A, Gwinner W, Mengel M, *et al.* Transcriptome changes in renal allograft protocol biopsies at 3 months precede the onset of interstitial fibrosis/tubular atrophy (IF/TA) at 6 months. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2009;24:2567-75.
29. Schwarz A, Gwinner W, Hiss M, Radermacher J, Mengel M, Haller H. Safety and adequacy of renal transplant protocol biopsies. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2005;5:1992-6.

La presente invención no debe quedar limitada en su alcance por las realizaciones descritas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. También se pretende que dichas modificaciones entren dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas. Además, debe entenderse que todos los valores son aproximados y se proporcionan para su descripción.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un receptor de aloinjerto renal en riesgo de daño crónico del aloinjerto o fibrosis intersticial y atrofia tubular (FI/AT) que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar una biblioteca de expresión como patrón de comparación;
 - (b) aislar ARNm de una muestra de biopsia que se ha obtenido del receptor del aloinjerto renal;
 - (c) sintetizar ADNc a partir del ARNm;
 - (d) detectar el nivel de transcripción de un conjunto de firmas génicas preseleccionado en el ADNc de la etapa (c)
 - (e) comparar el nivel de transcripción del conjunto de firmas génicas preseleccionado con el nivel de transcripción del patrón de comparación y
 - (f) identificar al receptor del aloinjerto renal como en riesgo de daño crónico del aloinjerto o FI/AT si el nivel de transcripción del conjunto de firmas génicas preseleccionado es mayor que el nivel de transcripción del patrón de comparación, donde el conjunto de firmas génicas preseleccionado comprende los genes KLHL13, KAAG1, MET, SPRY4, SERINC5, CHCHD10, FJX1, WNT9A, RNF149, ST5, TGIF1, RXRA y ASB15.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende seleccionar el receptor del aloinjerto renal para el tratamiento para prevenir el daño crónico del aloinjerto o FI/AT si el nivel de transcripción del conjunto de firmas génicas preseleccionado es significativamente mayor que el nivel de transcripción del patrón de comparación.
3. El método de la reivindicación 2, donde el receptor del aloinjerto renal se selecciona para el tratamiento que comprende administrar un agente inmunosupresor al receptor del aloinjerto renal identificado como con riesgo de daño crónico del aloinjerto o FI/AT.
4. El método de la reivindicación 3, donde el agente inmunosupresor es ciclosporina.
5. El método de la reivindicación 4, donde el receptor del aloinjerto renal identificado como en riesgo de daño crónico del aloinjerto o FI/AT se selecciona para el tratamiento con una enzima convertidora de angiotensina.
6. El método de la reivindicación 1, que comprende el uso de genes seleccionados del grupo que consiste en Beta Actina (ACTB), proteína ribosómica 60S P0 (RPLPO), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y ARN ribosómico 18s como control negativo.
7. Un kit para identificar receptores de aloinjertos renales en riesgo de daño crónico del aloinjerto o FI/AT, que comprende un recipiente que contiene cebadores para un conjunto de firmas génicas de 13 miembros e instrucciones de uso impresas, donde el conjunto de firmas génicas comprende los genes KLHL13, KAAG1, MET, SPRY4, SERINC5, CHCHD10, FJX1, WNT9A, RNF149, ST5, TGIF1, RXRA y ASB15.
8. El kit de la reivindicación 7, que comprende además un segundo recipiente que contiene cebadores para un conjunto de genes de mantenimiento.
9. El kit de la reivindicación 8 que comprende además un tercer recipiente que contiene una solución tampón.
10. Un conjunto de cebadores para un conjunto de firmas de 13 genes seleccionado que comprende los genes KLHL13, KAAG1, MET, SPRY4, SERINC5, CHCHD10, FJX1, WNT9A, RNF149, ST5, TGIF1, RXRA y ASB15.
11. El método de la reivindicación 2, donde el receptor del aloinjerto renal se selecciona para un tratamiento que comprende la administración de un agente antifibrótico.
12. El método de la reivindicación 11, donde el agente antifibrótico es pirfenidona.
13. El método de la reivindicación 2, donde el daño del aloinjerto comprende el rechazo del aloinjerto.
14. El método de la reivindicación 2, donde el daño del aloinjerto es fibrosis renal.
15. Un método para seleccionar un receptor de aloinjerto renal para el tratamiento para reducir el riesgo de daño crónico del aloinjerto o FI/AT, que comprende
 - (a) proporcionar una biblioteca de expresión como patrón de comparación
 - (b) aislar ARNm de una muestra de biopsia que se ha obtenido del receptor del aloinjerto renal;
 - (c) sintetizar ADNc a partir del ARNm;
 - (d) detectar el nivel de transcripción de un conjunto de firmas génicas preseleccionado en el ADNc de la etapa (c);
 - (e) comparar el nivel de transcripción del conjunto de firmas génicas preseleccionado con el nivel de transcripción del patrón de comparación
 y

(f) seleccionar al paciente para el tratamiento si el nivel de transcripción del conjunto de firmas génicas preseleccionado es significativamente mayor que el nivel de transcripción del patrón de comparación, donde el conjunto de firmas génicas preseleccionado comprende los genes KLHL13, KAAG1, MET, SPRY4, SERINC5, CHCHD10, FJX1, WNT9A, RNF149, ST5, TGIF1, RXRA y ASB15.

5 16. Un método para seleccionar un receptor de aloinjerto renal para el tratamiento a fin de reducir el riesgo de daño crónico del aloinjerto o FI/AT, que comprende

10 comparar el nivel de transcripción de un conjunto de firmas génicas preseleccionado obtenido del receptor del aloinjerto renal con el nivel de transcripción de una biblioteca de expresión de comparación y seleccionar el receptor del aloinjerto renal para el tratamiento del rechazo del aloinjerto o FI/AT si el nivel de transcripción del conjunto de firmas génicas preseleccionado es significativamente mayor que el nivel de transcripción del patrón de comparación, donde el conjunto de firmas génicas preseleccionado comprende los genes KLHL13, KAAG1, MET, SPRY4, SERINC5, CHCHD10, FJX1, WNT9A, RNF149, ST5, TGIF1, RXRA y ASB15.

15 17. El método de la reivindicación 15, en el que el paciente seleccionado tiene riesgo de rechazo del aloinjerto.

20 18. El método de la reivindicación 16, donde el paciente seleccionado tiene riesgo de daño del aloinjerto.

19. El método de la reivindicación 17, donde el paciente se selecciona para un tratamiento que comprende administrar un agente inmunosupresor.

25 20. El método de la reivindicación 1, que comprende detectar el nivel de transcripción de un conjunto de firmas génicas preseleccionado de la etapa (e) con RT-PCR.

21. El método de la reivindicación 1, que comprende detectar el nivel de transcripción de un conjunto de firmas génicas preseleccionado de la etapa (e) con un kit de ensayo de nanostring.

30 22. El método de la reivindicación 1, que comprende detectar el nivel de transcripción de un conjunto de firmas génicas preseleccionado de la etapa (e) con el kit de ensayo MiSeq.

23. El kit de la reivindicación 7, que comprende además un patrón de comparación.