

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 673**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08846586 .9**
- 96 Fecha de presentación: **06.11.2008**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2209916**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.07.2010**

54 Título: **Firmas de expresión génica para nefropatía de aloingerto crónica/esclerosante**

30 Prioridad:
08.11.2007 EP 07120263

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.04.2012

73 Titular/es:
**NOVARTIS AG
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**SAINT-MEZARD, Pierre y
ZHANG, Hai**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 379 673 T3

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

DESCRIPCIÓN

Firmas de expresión génica para nefropatía de aloinjerto crónica/esclerosante.

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere en general a las pruebas analíticas de muestras de tejido *in vitro*, y más particularmente a pruebas basadas en genes o proteínas útiles en el diagnóstico clínico de nefropatía de aloinjerto crónica.

Antecedentes de la invención

10 El éxito del trasplante de riñón conduce a tasas de supervivencia del injerto a un año del orden del 90% y se correlaciona con el desarrollo de agentes inmunosupresores potentes para prevenir y tratar episodios de rechazo de trasplante agudo ("RA"). La disfunción del trasplante crónica es un fenómeno en trasplantes de órganos sólidos que presentan un deterioro gradual de la función del injerto de meses a años tras el trasplante, conduciendo en última instancia a fracaso del injerto, y que va acompañada por rasgos histológicos característicos. Clínicamente, la disfunción crónica del trasplante en injertos de riñón, por ejemplo, nefropatía de aloinjerto crónica/esclerosante ("chronic/sclerosing allograft nephropathy", "CAN") es la causa principal de pérdida del injerto tardía (aproximadamente el 3-5% al año). CAN (también denominado rechazo crónico (RC), se manifiesta por sí misma como una disminución lentamente progresiva en la tasa de filtración glomerular, habitualmente conjuntamente con proteinuria e hipertensión arterial. Este trastorno representa una consecuencia de la lesión inmunológica (por ejemplo, rechazo crónico) y el daño no inmunológico (por ejemplo, nefroesclerosis hipertensiva, o nefrotoxicidad de inmunosupresores como ciclosporina A) combinados, que conducen en última instancia a fibrosis y esclerosis del aloinjerto, asociadas con pérdida progresiva de la función renal. A pesar de la aplicación clínica de potentes fármacos inmunorreguladores y agentes biológicos, el rechazo crónico sigue siendo una complicación tras el trasplante grave y común. El rechazo crónico es un proceso progresivo sin pausa. No existe todavía ninguna terapia satisfactoria para CAN.

25 La única causa más común para el fracaso del injerto temprano, especialmente en el plazo de un mes tras el trasplante, es el rechazo inmunológico del aloinjerto. El impacto desfavorable del rechazo se magnifica por el hecho de que: (a) el uso de terapia antirrechazo a alta dosis, superpuesto con la inmunosupresión de mantenimiento, es responsable principalmente de la morbilidad asociada con el trasplante, (b) la inmunización contra especificidades de HLA "públicas" resultante de un injerto rechazado hace que sea difícil volver a someter a un trasplante a esta población de pacientes y (c) el retorno del receptor inmunizado con un injerto fracasado al conjunto de pacientes que esperan un trasplante potencia el perpetuo problema de la escasez de órganos.

30 La evaluación histopatológica del tejido de biopsia es el método de referencia para el diagnóstico de CAN, mientras que la predicción de la aparición de CAN es actualmente imposible. El diagnóstico de CAN se basa a menudo en la interpretación dependiente del observador de alteraciones histológicas inespecíficas, y el pronóstico del paciente sigue siendo difuso.

35 La diferenciación del diagnóstico de rechazo, por ejemplo, CAN, de otras etiologías para la disfunción del injerto y la institución de una terapia eficaz es un proceso complejo porque: (a) la biopsia de injertos con aguja gruesa percutánea, la mejor de las herramientas actuales disponibles para diagnosticar el rechazo se realiza habitualmente tras el "hecho", es decir, la disfunción del injerto y el daño del injerto (irreversible en algunos casos) ya están presentes, (b) el análisis morfológico del injerto proporciona pistas modestas con respecto a la posibilidad de revertir un episodio de rechazo dado, y pistas mínimas referentes a la probabilidad de recaída ("rebote"), y (c) la base mecánica del fenómeno de rechazo, un requisito previo para el diseño de estrategias terapéuticas, está escasamente definida por los índices de diagnóstico actuales, incluyendo características morfológicas de rechazo.

45 El diagnóstico de, por ejemplo, rechazo de aloinjerto renal se realiza habitualmente por el desarrollo de la disfunción de injerto (por ejemplo, un aumento en la concentración de creatinina sérica) y pruebas morfológicas de lesión del injerto en zonas del injerto que también manifiestan infiltración de células mononucleares. Sin embargo, se aplican dos advertencias al uso de la función renal anómala como indicador del proceso de rechazo: en primer lugar, el deterioro de la función renal no siempre está disponible como pista clínica para diagnosticar el rechazo puesto que muchos de los injertos renales cadavéricos padecen insuficiencia renal aguda (reversible) en el periodo tras el trasplante inmediato debido a lesión por los procedimientos de recogida y conservación *ex vivo*. En segundo lugar, incluso cuando está presente función renal inmediatamente intacta, podría desarrollarse disfunción del injerto debida a una causa no inmunológica, tal como la propia terapia inmunosupresora.

50 Por ejemplo, la nefrotoxicidad por ciclosporina (CsA), una complicación que no se identifica fácilmente basándose únicamente en las concentraciones plasmáticas/sanguíneas de CsA, es una complicación común. La importancia clínica de distinguir el rechazo de la nefrotoxicidad por CsA no puede exagerarse, puesto que las estrategias terapéuticas son diametralmente opuestas: el aumento escalonado de los inmunosupresores para el rechazo, y la reducción de la dosificación de CsA para la nefrotoxicidad.

55 Como tales, las modalidades de diagnóstico y monitorización actuales no son indicadas para el diagnóstico de CAN, particularmente en el estadio temprano y se necesitan nuevas estrategias para mejorar la supervivencia del injerto a

largo plazo. Por consiguiente, existe una necesidad de identificar pruebas basadas en genes o proteínas que sean más sensibles y que puedan usarse en el diagnóstico clínico del rechazo, especialmente en un estado temprano y/o preclínico. Específicamente, el diagnóstico molecular, como la obtención del perfil de expresión génica, puede ayudar a refinar adicionalmente la clasificación de la enfermedad BANFF 97 (Racusen, *et al.*, 1999, *Kidney Int.* 55(2):713-23), y también puede emplearse como biomarcadores de diagnóstico temprano o predictivos. La predicción y el diagnóstico exactos del desenlace del episodio de CAN son cruciales en la tendencia para optimizar los tratamientos y prevenir el desarrollo de CAN y pérdida de función renal.

Sumario

La presente invención se basa, en parte, en el hallazgo de que el aumento o la disminución de la expresión de uno o más genes y/o proteínas codificadas puede asociarse de manera fiable con ciertos estados de rechazo de injertos. Por tanto, como resultado de los datos descritos en el presente documento, están ahora disponibles métodos para el diagnóstico rápido y fiable de rechazo agudo y crónico, incluso en casos en los que las biopsias de aloinjertos muestran sólo infiltrados celulares leves.

Se describe en el presente documento por primera vez un análisis de genes que se regulan por incremento y/o se regulan por disminución simultáneamente, y que proporcionan una "firma molecular" para detectar y/o clasificar de manera exacta el rechazo crónico de trasplantes. El diagnóstico temprano del rechazo de aloinjertos (por ejemplo, rechazo de aloinjerto renal) y nuevos marcadores de pronóstico son importantes para minimizar y personalizar la inmunosupresión. Además del diagnóstico diferencial histopatológico, la obtención del perfil de expresión génica mejora significativamente la clasificación de la enfermedad definiendo estas firmas moleculares.

Por tanto, los resultados del estudio presentados en el presente documento demuestran la capacidad para usar el análisis de la firma molecular para diferenciar clases de rechazo de aloinjertos. Por primera vez, este trabajo ha mostrado que una firma molecular podría diferenciar biopsias según la gravedad gradual de CAN (I, II, III). La lista de 33 conjuntos de sondas/genes identificados en este análisis clasificaba correctamente los grados de CAN con un 90% de exactitud en seres humanos y un 100% de exactitud es un estudio con NHP de CAV. Es difícil lograr una tasa de clasificación errónea inferior debido a la ambigüedad inherente del diagnóstico histopatológico visual. Las diferencias entre CAN de grado I y II son ligeras y propensas a ponderación subjetiva por patólogos individuales. Esta tendencia está bien reflejada por la expresión génica. Por ejemplo, mientras que las muestras de grado III se separan fácilmente, varias muestras podrían clasificarse como o bien de grado I o bien de II. En este sentido, las muestras de grado I y grado II se clasifican a menudo de manera diferencial mediante los algoritmos PAM y SVM (datos no mostrados). El diagnóstico diferencial temprano será importante para la intervención para reducir CAN antes de que se manifieste el grado III supuestamente irreversible, teniendo en cuenta que el 25% de los pacientes demuestran CAN de grado II un año tras el trasplante).

Por consiguiente, se describen en el presente documento métodos y composiciones para monitorizar el estado de un órgano trasplantado en un sujeto. Esto implica evaluar el rechazo del trasplante en un sujeto determinando el nivel (es decir, la magnitud) de la expresión génica en una muestra tras el trasplante obtenida del sujeto y comparando la expresión relativa de los genes marcadores con un nivel de referencia del marcador. La regulación de la expresión génica (es decir, aumento o disminución de la expresión génica) de una pluralidad de genes seleccionados en la muestra indica rechazo.

La expresión alterada de la combinación de los marcadores génicos identificados, que se enumeran en la tabla 1, indica rechazo del trasplante. En un aspecto de la descripción, el aumento de la expresión de uno, dos o más genes de cualquiera de los genes de la tabla 1, preferiblemente al menos 5, 10, 15 ó 18 de los genes de la tabla 1 indica rechazo del trasplante (y en algunas realizaciones también permite que se determine o estime el grado de CAN). En otro aspecto de la descripción, la disminución de la expresión de uno, dos o más genes de cualquiera de los genes de la tabla 1, preferiblemente al menos 5, 10 ó 15 de los genes de la tabla 1, indica rechazo del trasplante (y en algunas realizaciones también permite que se determine o estime el grado de CAN). Normalmente, se selecciona una gama de marcadores, algunos de los cuales muestran disminución de la expresión y algunos de los cuales muestran aumento de la expresión en comparación con valores control.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente descripción proporciona un método para evaluar la aparición de un rechazo crónico de un riñón trasplantado en un sujeto, que comprende las etapas de;

- (a) obtener una muestra tras el trasplante del sujeto;
- (b) determinar el nivel de expresión en la muestra tras el trasplante de una combinación de una pluralidad de genes seleccionados del grupo de los genes identificados en la tabla 1;
- (c) comparar el nivel de expresión génica de dicha pluralidad de genes en la muestra tras el trasplante con la magnitud de expresión génica de los mismos genes en una muestra control para generar un perfil de expresión diferencial; y
- (d) comparar el perfil de expresión diferencial con uno o más perfiles de expresión diferencial de referencia indicativos de uno o más estadios de nefropatía de aloinjerto crónica/esclerosante,

evaluando de ese modo la aparición de rechazo del órgano trasplantado en el sujeto.

La presente invención proporciona un método de clasificación del estadio de nefropatía de aloinjerto crónica/esclerosante en un sujeto que padece rechazo crónico de un riñón trasplantado, que comprende las etapas de:

- 5 (a) obtener una muestra tras el trasplante del sujeto;
 - (b) determinar el nivel de expresión en la muestra tras el trasplante de los genes identificados en la tabla 1;
 - (c) comparar el nivel de expresión génica de dicha pluralidad de genes en la muestra tras el trasplante con la magnitud de expresión génica de los mismos genes en una muestra control para generar un perfil de expresión diferencial; y
 - 10 (d) comparar el perfil de expresión diferencial con uno o más perfiles de expresión diferencial de referencia indicativos de uno o más estadios nefropatía de aloinjerto crónica/esclerosante,
- clasificando de ese modo el estadio de nefropatía de aloinjerto crónica/esclerosante en el sujeto.

En una realización preferida, los genes tienen un perfil de expresión que distingue CAN en estadio III de un estadio más temprano, preferiblemente estadio I y/o estadio II.

15 La descripción se refiere a un método para evaluar la aparición de rechazo crónico de un órgano trasplantado en un sujeto, obteniendo una muestra tras el trasplante del sujeto. Se determina el nivel de expresión génica en la muestra tras el trasplante de una pluralidad de genes mostrados en la tabla 1. El nivel de expresión génica del al menos un gen en la muestra tras el trasplante se compara con el nivel de expresión génica del mismo gen en una muestra control. En una realización, un control incluye biopsias de un riñón sano no trasplantado o de un riñón trasplantado que no muestra signos de rechazo. La regulación por incremento o la regulación por disminución de al menos un gen indica que es probable que el sujeto experimente rechazo del trasplante, evaluando de ese modo la aparición de rechazo del órgano trasplantado en el sujeto. En una realización, la muestra comprende células obtenidas del sujeto. En una realización, la muestra se selecciona del grupo que consiste en: una biopsia del injerto; sangre; suero; y orina. El método puede usarse para evaluar el rechazo crónico del trasplante y para determinar la aparición de rechazo. La regulación por incremento o la regulación por disminución de la pluralidad de genes en la tabla 1 proporciona una firma molecular que indica que es probable que el sujeto experimente rechazo crónico del trasplante, por ejemplo, nefropatía de aloinjerto crónica/esclerosante. En una realización preferida, el estadio de rechazo del trasplante es grado I, grado II o grado III. El nivel de expresión en la muestra puede determinarse cuantitativamente.

20 Un nivel de expresión de la pluralidad de genes en la muestra que difiere del nivel de expresión de la muestra control en un factor de al menos aproximadamente 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o aproximadamente 2,0, indica que es probable que el sujeto experimente rechazo crónico del trasplante (se hace referencia a la tabla 4 para una orientación de los genes de la tabla 1 que presentan tales cambios en los niveles de expresión). En el caso de regulación por incremento de la expresión, los cambios observados en los genes son mayores y por tanto se prefiere que se observen cambios de los niveles de expresión de al menos 3,0 o más, preferiblemente al menos 3,5, 4, 5, 6 o más en los genes marcadores de interés (se hace referencia a la tabla 4 para orientación adicional).

25 En un aspecto, la descripción proporciona un método para evaluar la progresión del rechazo, por ejemplo rechazo crónico, de un órgano trasplantado en un sujeto. Se determina una muestra tras el trasplante de un sujeto y el nivel de expresión génica en la muestra tras el trasplante de una combinación de genes seleccionados del grupo de genes identificados en la tabla 1. El patrón de expresión génica del al menos un gen en la muestra tras el trasplante se compara con el patrón de expresión génica del/de los mismo(s) gen(es) en una muestra de control. En el que una similitud en el patrón de expresión del patrón de expresión génica de la combinación de gen(es) en la muestra tras el trasplante en comparación con el patrón de expresión de la misma combinación de gen(es) en un perfil de expresión de una muestra de control indica un grado de rechazo de trasplante, evaluando de ese modo la progresión del rechazo del órgano trasplantado en el sujeto. En una realización, la muestra comprende células obtenidas del sujeto. En otra realización, la muestra se selecciona del grupo que consiste en: una biopsia de injerto; sangre; suero; y orina. En una realización, el rechazo es nefropatía de aloinjerto crónica/esclerosante. En una realización, el estadio del rechazo del trasplante se selecciona del grupo que consiste en: grado I; grado II; y grado III.

30 En otro aspecto, la descripción se refiere a un método de monitorización del rechazo de trasplantes, por ejemplo rechazo crónico, en un sujeto tomando como valor inicial el nivel de expresión génica de una combinación de una pluralidad de genes en una muestra obtenida de un sujeto trasplantado que se sabe que no desarrolla rechazo. El nivel de expresión génica que corresponde a la combinación de una pluralidad de genes se detecta en una muestra obtenida del sujeto tras el trasplante. El primer valor se compara con el segundo valor, en el que un primer valor inferior o superior al segundo valor predice que el sujeto trasplantado corre el riesgo de desarrollar rechazo, en el que la pluralidad de genes se define en la tabla 1.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método de monitorización del rechazo de trasplantes, por ejemplo,

- rechazo crónico, en un sujeto detectando un nivel de expresión génica correspondiente a una combinación de una pluralidad de genes a partir de una muestra obtenida de un sujeto donante en el día del trasplante. El nivel de expresión génica correspondiente a la pluralidad de genes se detecta a partir de una muestra obtenida de un sujeto receptor tras el trasplante. El primer nivel se compara con el segundo nivel, en el que un primer nivel inferior o superior al segundo nivel predice que el sujeto receptor corre el riesgo de desarrollar rechazo; en el que la pluralidad de genes es tal como se define en la tabla 1.
- En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para monitorizar el rechazo de trasplantes, por ejemplo rechazo crónico, en un sujeto que corre el riesgo del mismo obteniendo una muestra antes de la administración de un sujeto trasplantado antes de la administración de un agente inhibidor del rechazo. Se detecta el patrón de expresión génica de una pluralidad de genes en la muestra antes de la administración. Se obtienen una o más muestras tras la administración del sujeto trasplantado y se detecta el patrón de expresión génica de una pluralidad de genes en la muestra o muestras tras la administración. Se compara el patrón de expresión génica de la pluralidad de genes en la muestra antes de la administración con el patrón de expresión génica en la muestra o muestras tras la administración, y se ajusta el agente por consiguiente, en el que la pluralidad de genes se define en la tabla 1.
- En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para prevenir, inhibir, reducir o tratar el rechazo de trasplantes, por ejemplo rechazo crónico, en un sujeto que necesita tal tratamiento que comprende administrar al sujeto un compuesto que modula la síntesis, expresión o actividad de uno o más genes o productos génicos codificados de los mismos de genes identificados en la tabla 1, de modo que se mejora al menos un síntoma de rechazo.
- En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para identificar agentes para su uso en la prevención, inhibición, reducción o tratamiento del rechazo de trasplantes, por ejemplo rechazo crónico, que comprende monitorizar el nivel de expresión génica de uno o más genes o productos génicos identificados en la tabla 1.
- El patrón de expresión génica puede evaluarse detectando la presencia de una proteína codificada por el gen, por ejemplo mediante un reactivo que se une específicamente a la proteína. La presencia de la proteína puede detectarse usando un reactivo que se une específicamente a la proteína. El patrón de expresión génica puede detectarse mediante técnicas seleccionadas del grupo que consiste en análisis de transferencia de tipo Northern, PCR con transcripción inversa y PCR cuantitativa en tiempo real.
- Puede usarse la detección de la combinación de la pluralidad de genes o productos de expresión de los mismos enumerados en la tabla 1 como biomarcador para el rechazo de trasplantes. También puede usarse un compuesto que modula la síntesis, expresión de la actividad de uno o más genes identificados en la tabla 1, o un producto de expresión de los mismos, para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento del rechazo de trasplantes en un sujeto. El rechazo de trasplantes según cualquier método o uso de la invención puede ser nefropatía de aloinjerto crónica/esclerosante y el/los gen(es) se selecciona(n) del grupo que consiste en los genes identificados en la tabla 1.
- En otro aspecto, la descripción se refiere a un método de monitorización del rechazo de trasplantes en un sujeto tomando como valor inicial el nivel de expresión génica correspondiente a una combinación de una pluralidad de genes en una muestra de un sujeto trasplantado que se sabe que no desarrolla rechazo. El nivel de expresión génica correspondiente a la combinación de la pluralidad de genes puede compararse con la magnitud de la expresión génica en una muestra obtenida de un sujeto tras el trasplante. El primer valor puede compararse con el segundo valor, en el que un primer valor inferior o superior al segundo valor predice que el sujeto trasplantado corre el riesgo de desarrollar rechazo, en el que la pluralidad de genes es tal como se define en la tabla 1.
- En otra realización de la descripción, el método de monitorización del rechazo de trasplantes puede realizarse detectando un patrón de expresión génica correspondiente a una combinación de una pluralidad de genes de una muestra obtenida de un sujeto donante en el día del trasplante y de una muestra obtenida de un sujeto receptor tras el trasplante. El patrón de expresión génica detectado en las dos muestras puede compararse. Por ejemplo la magnitud de la expresión génica en las dos muestras puede compararse. Una similitud en el patrón de expresión génica, por ejemplo en la magnitud de expresión génica, predice que el sujeto receptor corre el riesgo de desarrollar rechazo.
- Aún en otro aspecto, la descripción se refiere a un método de monitorización del rechazo de trasplantes en un sujeto obteniendo una muestra antes de la administración de un sujeto trasplantado antes de la administración de un agente inhibidor del rechazo; y detectando el patrón de expresión génica, por ejemplo la magnitud de la expresión génica, de una pluralidad de genes en la muestra antes de la administración. El patrón de expresión génica, por ejemplo la magnitud de la misma, de la pluralidad de genes en la muestra antes de la administración puede compararse con el patrón de expresión génica en la muestra o muestras tras la administración.
- Por tanto, como resultado del trabajo descrito en el presente documento, están disponibles ahora métodos para cuantificar de manera exacta la expresión de genes marcadores en tejido de biopsia, orina, células mononucleares de sangre periférica y otros líquidos corporales, y para correlacionar la magnitud de la expresión de estos genes con el rechazo de rechazo crónico de aloinjertos, y en algunas realizaciones para distinguir diferentes estadios de

rechazo.

La presente invención también proporciona el uso de una pluralidad de sondas de ácido nucleico, cada una de las cuales hibrida específicamente con un gen diferente en la tabla 1 como biomarcador para nefropatía de aloinjerto crónica/esclerosante

- 5 Preferiblemente, la pluralidad de sondas de ácido nucleico pueden detectar la expresión de los genes SLC1A3, CD163, RDH12 y FLJ32569.

Descripción detallada

Para facilitar adicionalmente un entendimiento de la presente invención, se definen varios términos y expresiones a continuación:

- 10 Los términos “regulación por disminución” o “regulado por disminución” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a la disminución de la cantidad de un gen diana o una proteína diana. El término “regulación por disminución” o “regulado por disminución” también se refiere a las disminuciones en procesos o cascadas de transducción de señales que implican un gen diana o una proteína diana.

- 15 El término “trasplante” tal como se usa en el presente documento se refiere al proceso de tomar una célula, tejido u órgano, denominado “trasplante” o “injerto” de un sujeto y colocarlo o colocarlos en un sujeto (habitualmente) diferente. El sujeto que proporciona el trasplante se denomina “donante” y el sujeto que recibe el trasplante se denomina “receptor”. Un órgano o injerto, trasplantado entre dos sujetos genéticamente diferentes de la misma especie se denomina “aloinjerto”. Un injerto trasplantado entre sujetos de diferentes especies se denomina “xenoinjerto”.

- 20 El término “rechazo del trasplante” tal como se usa en el presente documento se define como deterioro funcional y estructural del órgano debido a una respuesta inmunitaria activa expresada por el receptor, e independiente de causas no inmunológicas de disfunción orgánica.

- 25 El término “rechazo agudo” tal como se usa en el presente documento se refiere a un rechazo del órgano trasplantado que se desarrolla tras los primeros 5-60 días tras el trasplante. Es generalmente una manifestación de lesión inmunitaria mediada por células. Se cree que están implicados tanto mecanismos de citotoxicidad como de hipersensibilidad retrasados. La lesión inmunitaria se dirige contra HLA, y posiblemente otros antígenos específicos de células expresados por el epitelio tubular y endotelio vascular.

- 30 El término “rechazo crónico” tal como se usa en el presente documento se refiere a un rechazo del órgano trasplantado que se desarrolla tras los primeros 30-120 días tras el trasplante. El término “rechazo crónico” también se refiere a una consecuencia de lesión inmunológica (por ejemplo rechazo crónico) y daño no inmunológico (por ejemplo nefroesclerosis hipertensiva, o nefrotoxicidad de inmunosupresores como ciclosporina A) combinados, que tienen lugar meses o años tras el trasplante y que conducen en última instancia a fibrosis y esclerosis del aloinjerto, asociado con pérdida progresiva de función renal.

- 35 El término “sujeto” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier organismo vivo en el que se produce una respuesta inmunitaria. El término sujeto incluye, pero no se limita a, seres humanos, primates no humanos tales como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja tales como ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas, y similares. El término no indica una edad o sexo particular. Por tanto, se pretende cubrir sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, ya sean macho o hembra.

- 40 Un “gen” incluye un polinucleótido que contiene al menos un marco de lectura abierto que puede codificar para un polipéptido o proteína particular después de transcribirse y traducirse. Cualquiera de las secuencias de polinucleótido descritas en el presente documento puede usarse para identificar fragmentos más grandes o secuencias codificantes de longitud completa del gen con las que están asociadas. Los expertos en la técnica conocen métodos de aislamiento de secuencias de fragmentos más grandes, algunos de los cuales se describen en el presente documento.

- 45 Un “producto génico” incluye un aminoácido (por ejemplo, péptido o polipéptido) generado cuando un gen se transcribe y se traduce.

- 50 El término “magnitud de expresión” tal como se usa en el presente documento se refiere a cuantificar niveles de transcritos del gen marcador y comparar esta cantidad con la cantidad de transcritos de un gen expresado de manera constitutiva. El término “nivel” o “magnitud de expresión” significa una “cantidad normalizada o estandarizada de expresión génica”. Por ejemplo, la expresión global de todos los genes en células varía (es decir, no es constante). Para evaluar de manera exacta si la detección del aumento del transcrito de ARNm es significativa, es preferible “normalizar” la expresión génica para comparar de manera exacta los niveles de expresión entre muestras, es decir, es un nivel de base frente al que se compara la expresión génica. Se logró la cuantificación de transcritos génicos usando reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) competitiva

- 55

y se determinó la magnitud de expresión génica calculando la razón de la cantidad de expresión génica de cada gen marcador con respecto a la cantidad de expresión génica del gen expresado.

El término “expresado de manera diferencial”, tal como se aplica a un gen, incluye la producción diferencial de ARNm transcrito a partir de un gen o un producto de proteína codificado por el gen. Un gen expresado de manera diferencial puede sobreexpresarse o subexpresarse en comparación con el nivel de expresión de una célula normal o control. En un aspecto, incluye un diferencial que es al menos 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces o al menos 10 veces superior o inferior que el nivel de expresión detectado en una muestra de control. En una realización preferida, la expresión es superior que la muestra de control. El término “expresado de manera diferencial” también incluye secuencias de nucleótidos en una célula o tejido en los que se expresan cuando son silenciosas en una célula control o no se expresan cuando se expresan en una célula control.

El término “muestra” tal como se usa en el presente documento se refiere a células obtenidas de una biopsia. El término “muestra” también se refiere a células obtenidas de una muestra de líquidos que incluye, pero no se limita a, una muestra de líquido de lavado broncoalveolar, una muestra de bilis, líquido pleural o líquido peritoneal, o cualquier otro líquido secretado o excretado por un aloinjerto que funciona de manera normal o anómala, o cualquier otro líquido resultante de la exudación o transudación a través de un aloinjerto o en proximidad anatómica a un aloinjerto, o cualquier líquido en comunicación de fluido con el aloinjerto. Una muestra de prueba de líquido también puede obtenerse esencialmente a partir de cualquier líquido corporal incluyendo: sangre (incluyendo sangre periférica), líquido linfático, sudor, líquido peritoneal, líquido pleural, líquido de lavado broncoalveolar, líquido pericárdico, jugo gastrointestinal, bilis, orina, heces, líquido tisular o líquido de hinchazón, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, o cualquier otro líquido nombrado o no nombrado obtenido de la zona anatómica en proximidad al aloinjerto u obtenido de un conducto de líquidos en comunicación de fluido con el aloinjerto. Una “muestra de prueba de líquido tras el trasplante” se refiere a una muestra obtenida de un sujeto tras haberse realizado el trasplante.

También pueden obtenerse muestras secuenciales del sujeto y la cuantificación de marcadores génicos de activación inmunitaria determinados tal como se describe en el presente documento, y el transcurso del rechazo puede seguirse a lo largo de un periodo de tiempo. En este caso, por ejemplo, el nivel inicial (por ejemplo, magnitud) de expresión génica de los genes marcadores de activación inmunitaria es el nivel (por ejemplo, magnitud) de expresión génica en una muestra tras el trasplante tomada tras el trasplante. Por ejemplo, pueden tomarse una muestra o muestras iniciales en el plazo del periodo de no rechazo, por ejemplo, en el plazo de una semana del trasplante y el nivel (por ejemplo, magnitud) de expresión de genes marcadores en estas muestras puede compararse con el nivel (por ejemplo, magnitud) de expresión de los genes en muestras tomadas tras una semana. En una realización, las muestras se toman en las semanas 6, 12 y 24 tras el trasplante.

El término “biopsia” tal como se usa en el presente documento se refiere a una muestra obtenida extrayendo tejido de pacientes vivos para el examen de diagnóstico. El término incluye biopsias por aspiración, biopsias con cepillo, biopsias de vellosidades coriónicas, biopsias endoscópicas, biopsias por escisión, biopsias con aguja (muestras obtenidas mediante extracción por aspiración a través de una aguja apropiada o trocar que perfora la piel, o la superficie externa de un órgano, y en el tejido subyacente que va a examinarse), biopsias a cielo abierto, biopsias con sacabocados (trefina), biopsias por afeitado, biopsias con esponja y biopsias en cuña. En una realización, se usa una biopsia por aspiración con aguja fina. En otra realización, se usa una biopsia con miniaguja gruesa. También puede usarse una biopsia con aguja gruesa percutánea convencional.

El término “regulación por incremento” o “regulado por incremento” se usa de manera intercambiable en el presente documento y se refiere al aumento o elevación de la cantidad de un gen diana o una proteína diana. El término “regulación por incremento” o “regulado por incremento” también se refiere al aumento o elevación de procesos o cascadas de transducción de señales que implican un gen diana o una proteína diana.

El término “regulación por disminución” o “regulado por disminución” se usa de manera intercambiable en el presente documento y se refiere a la disminución o elevación de la cantidad de un gen diana o una proteína diana. El término “regulación por disminución” o “regulado por disminución” también se refiere a la disminución o reducción de procesos o cascadas de transducción de señales que implican un gen diana o una proteína diana.

Un “conjunto de sondas” tal como se usa en el presente documento se refiere a un grupo de ácidos nucleicos que pueden usarse para detectar dos o más genes. La detección puede ser, por ejemplo, a través de amplificación como en PCR y RT-PCR, o a través de hibridación, como en un microalineamiento, o a través de destrucción selectiva y protección, como en ensayos basados en la degradación enzimática selectiva de ácidos nucleicos mono o bicatenarios. Las sondas en un conjunto de sondas pueden estar marcadas con uno o más restos fluorescentes, radioactivos u otros restos detectables (incluyendo enzimas). Las sondas pueden ser de cualquier tamaño siempre que la sonda sea suficientemente grande para detectar selectivamente el gen deseado. Un conjunto de sondas puede estar en disolución, tal como sería típico para PCR múltiple, o un conjunto de sondas puede adherirse a una superficie sólida, como en un alineamiento o microalineamiento. Se sabe bien que compuestos tales como PNA pueden usarse en lugar de ácidos nucleicos para hibridar con genes. Además, las sondas pueden contener ácidos nucleicos poco comunes o no naturales tales como inosina.

Los términos “polinucleótido” y “oligonucleótido” se usan de manera intercambiable, e incluyen formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, o bien desoxirribonucleótidos o bien ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden realizar cualquier función, conocida o no conocida. Los siguientes son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, las modificaciones en la estructura de nucleótidos pueden conferirse antes o después del ensamble del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes distintos de nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente tras la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de marcaje. El término también incluye moléculas tanto monocatenarias como bicatenarias. A menos que se especifique o se requiera lo contrario, cualquier realización de esta invención que es un polinucleótido abarca tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias que se sabe o se predice que constituyen la forma bicatenaria.

Un polinucleótido está compuesto por una secuencia específica de cuatro bases de nucleótidos: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U) por guanina cuando el polinucleótido es ARN. Es decir, el término “secuencia de polinucleótido” es la representación alfabética de una molécula de polinucleótido. Esta representación alfabética puede introducirse en bases de datos en un ordenador que tiene una unidad de procesamiento central y usarse para aplicaciones bioinformáticas tales como búsquedas de homología y genómica funcional.

El término “ADNc” incluye ADN complementario, es decir, moléculas de ARNm presentes en una célula u organismo convertidas en ADNc con una enzima tal como transcriptasa inversa. Una “biblioteca de ADNc” incluye una colección de moléculas de ARNm presentes en una célula u organismo, convertidas en moléculas de ADNc con la enzima transcriptasa inversa, luego insertadas en “vectores” (otras moléculas de ADN que pueden continuar replicándose tras la adición de ADN foráneo). Los vectores para bibliotecas a modo de ejemplo incluyen bacteriófago, virus que infectan bacterias (por ejemplo, fago lambda). Entonces puede estudiarse con sondas la biblioteca para detectar el ADNc específico (y por tanto ARNm) de interés.

Un “cebador” incluye un polinucleótido corto, generalmente con un grupo 3'-OH libre que se une a una diana o “molde” presente en una muestra de interés hibridando con la diana, y después de eso promoviendo la polimerización de un polinucleótido complementario a la diana. Una “reacción en cadena de la polimerasa” (“PCR”) es una reacción en la que se producen copias duplicadas de un polinucleótido diana usando un “par de cebadores” o “conjunto de cebadores” que consiste en un cebador “aguas arriba” y un cebador “aguas abajo”, y un catalizador de la polimerización, tal como una ADN polimerasa, y normalmente una enzima polimerasa térmicamente estable. Se conocen bien en la técnica métodos para PCR, y se enseñan, por ejemplo, en MacPherson *et al.*, IRL Press at Oxford University Press (1991)). Todos los procedimientos de producción de copias duplicadas de un polinucleótido, tal como PCR o clonación génica, se denominan colectivamente en el presente documento “replicación”. Un cebador también puede usarse como sonda en reacciones de hibridación, tales como análisis de transferencia de tipo Southern o Northern (véase, por ejemplo, Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

El término “polipéptido” incluye un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácido, o peptidomiméticos. Las subunidades pueden unirse mediante enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad puede unirse mediante otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Tal como se usa en el presente documento, el término “aminoácido” incluye aminoácidos o bien naturales y/o no naturales o bien sintéticos, incluyendo glicina y ambos isómeros ópticos D o L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina comúnmente oligopéptido. Las cadenas peptídicas de más de tres o más aminoácidos se denominan polipéptido o proteína.

El término “hibridación” incluye una reacción en la que uno o más polinucleótidos reaccionan para formar un complejo que se estabiliza a través de enlaces por puentes de hidrógeno entre las bases de los residuos de nucleótidos. Los enlaces por puentes de hidrógeno pueden producirse mediante apareamiento de bases de Watson-Crick, unión de Hoogsteen o de cualquier otra manera específica de secuencia. El complejo puede comprender dos hebras que forman una estructura doble, tres o más hebras que forman un complejo multicatenario, una hebra de autohibridación individual, o cualquier combinación de los mismos. Una reacción de hibridación puede constituir una etapa en un procedimiento más extenso, tal como el inicio de una reacción de PCR, o la escisión enzimática de un polinucleótido mediante una ribozima.

Las reacciones de hibridación pueden realizarse en condiciones de diferente “rigurosidad”. La rigurosidad de una reacción de hibridación incluye la dificultad con la que cualquiera de dos moléculas de ácido nucleico hibridarán entre sí. En condiciones rigurosas, moléculas de ácido nucleico al menos el 60%, 65%, 70%, 75% idénticas entre sí permanecen hibridadas entre sí, mientras que moléculas con bajo porcentaje de identidad no pueden permanecer hibridadas. Un ejemplo no limitativo preferido de condiciones de hibridación altamente rigurosas son hibridación en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0,2X SSC,

SDS al 0,1% a 50°C, preferiblemente a 55°C, más preferiblemente a 60°C, e incluso más preferiblemente a 65°C.

5 Cuando se produce la hibridación en una configuración antiparalela entre dos polinucleótidos bicatenarios, la reacción se denomina “apareamiento” y los polinucleótidos se describen como “complementarios”. Un polinucleótido bicatenario puede ser “complementario” u “homólogo” a otro polinucleótido, si puede producirse hibridación entre una de las hebras del primer polinucleótido y el segundo. La “complementariedad” u “homología” (el grado en el que un polinucleótido es complementario con otro) es cuantificable en cuanto a la proporción de bases en hebras opuestas que se espera que se unan por puentes de hidrógeno entre sí, según reglas de apareamiento de bases generalmente aceptadas.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “marcador” incluye una molécula de polinucleótido o polipéptido que está presente o aumenta en cantidad o actividad en sujetos que corren el riesgo de rechazo de órganos. El cambio relativo en cantidad o actividad del marcador se correlaciona con la incidencia o el riesgo de incidencia de rechazo.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “panel de marcadores” incluye un grupo de marcadores, correlacionándose la cantidad o actividad de cada miembro con la incidencia o el riesgo de incidencia de rechazo de órganos. En ciertas realizaciones, un panel de marcadores puede incluir sólo aquellos marcadores que aumentan o bien en cantidad o bien en actividad en sujetos que corren el riesgo de rechazo de órganos. Un panel de marcadores comprende preferiblemente al menos 4 marcadores, tal como al menos 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 marcadores, por ejemplo al menos 15 marcadores. Se describen en otra parte genes preferidos.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “perfil de expresión diferencial” significa un perfil que contiene valores para cada marcador relevante que forma la base del perfil, deduciéndose los valores mediante la comparación de la magnitud de expresión en el material de muestra de prueba de cada marcador de interés (ya sea al nivel de ARN o proteína, pero preferiblemente al nivel de ARN), con la magnitud de expresión del mismo marcador de interés en una muestra de control (o con un valor control previamente derivado) y calculando por ejemplo la variación en veces o porcentaje de variación. Un ejemplo no limitativo de un perfil de expresión diferencial se facilita en la tabla 4 (cada una de las últimas tres columnas). Un perfil de expresión diferencial comprende preferiblemente valores para al menos 4 marcadores, tal como al menos 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 marcadores, por ejemplo al menos 15 marcadores.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “perfil de expresión diferencial de referencia” es un perfil de expresión diferencial que se sabe que es representativo de uno o más estadios de CAN y que puede usarse como base para la comparación con un perfil de expresión diferencial de una muestra de prueba para determinar si el perfil de la muestra de prueba es suficientemente similar al perfil de referencia para permitir la clasificación de la muestra de prueba. Un perfil de expresión diferencial de referencia puede deducirse (y normalmente ese deduce) reuniendo resultados de análisis de expresión de muestras en las que se conoce el estadio de CAN.

Biomarcadores de rechazo crónico

35 Está presente descripción proporciona biomarcadores para la progresión de fibrosis renal e inflamación crónica útiles como herramientas de diagnóstico y/o pronóstico para la prevención y el tratamiento de CAN. La invención se basa, en parte, en el hallazgo de que se modulan genes seleccionados en la disfunción de trasplante crónica, por ejemplo, CAN, siendo el grado de estas variaciones diferente entre los diversos estadios/grados de CAN. Los avances en técnicas de hibridación de ADN automatizadas altamente paralelas, combinados con la abundancia creciente de información de secuencias génicas humanas, han hecho viable analizar simultáneamente los niveles de expresión para miles de genes. Métodos tales como la RT-PCR cuantitativa gen por gen son altamente precisos pero relativamente laboriosos. Aunque es posible analizar la expresión de miles de genes usando PCR cuantitativa, el esfuerzo y los costes serían enormes. En su lugar, como ejemplo de análisis a gran escala, toda una población de ARNm puede convertirse en ADNc e hibridarse con un alineamiento ordenado de sondas que representan cualquier lugar desde diez hasta diez mil o más genes. La cantidad relativa de ADNc que hibrida con cada una de estas sondas es una medida del nivel de expresión del correspondiente gen. Entonces, los datos pueden analizarse estadísticamente para revelar patrones informativos de expresión génica. De hecho, el diagnóstico temprano de rechazo de aloinjerto renal y nuevos biomarcadores de pronóstico son importantes para minimizar y personalizar la inmunosupresión. Además del diagnóstico diferencial histopatológico, la obtención del perfil de expresión génica mejora significativamente la clasificación de la enfermedad definiendo una “firma molecular”.

Varios estudios previos han aplicado con éxito un enfoque transcriptómico para distinguir diferentes clases de trasplantes de riñón. Sin embargo, la heterogeneidad de las plataformas de microalineamientos y diversos métodos de análisis de datos complican la identificación de firmas de CAN robustas.

55 Para abordar esta cuestión, se realizó análisis de datos sobre los perfiles de expresión génica de biopsias de protocolo renal de pacientes con función de injerto estable y pacientes a los que se les ha diagnosticado grados variables de CAN. Tal como se presenta en el ejemplo I, este estudio identificó la intersección de múltiples firmas de expresión génica de diferentes conjuntos de datos de microalineamientos para deducir descriptores (es decir, marcadores génicos; biomarcadores) que pueden clasificar de manera exacta tejido con CAN. Es decir, la presente

5 invención se refiere a la identificación de genes, que se modulan (es decir, regulan por incremento o regulan por disminución) durante el rechazo, en particular durante la progresión de CAN. Se ha encontrado una correlación altamente significativa de manera estadística entre la expresión de uno o más gen(es) biomarcador(es) y CAN, proporcionando de ese modo una “firma molecular” para el rechazo de trasplantes (por ejemplo, CAN). Estos genes biomarcadores y sus productos de expresión pueden usarse en el manejo, pronóstico y tratamiento de pacientes que corren el riesgo de rechazo de trasplantes ya que son útiles para identificar órganos que es probable que experimenten rechazo y/o para determinar el grado de progresión de la enfermedad (por ejemplo, CAN).

10 Los datos dados a conocer en el presente documento demuestran que en situaciones clínicas reales, y en ausencia de manipulaciones moleculares de la expresión génica, combinaciones de genes son indicativas de CAN. En una realización, la combinación de genes biomarcadores/sondas que forman una firma molecular tras el trasplante de tejido son las mostradas a continuación en la tabla 1.

Tabla 1: La firma de expresión específica para CAN de 33 conjuntos de sonda/32 genes

Clasificación	Conjunto de sondas Affymetrix	Símbolo del gen	Ref. de sec. (NCBI)	Descripción del gen
1	202800_at	SLC1A3	NM_004172	familia del portador de solutos 1 (transportador de glutamato de alta afinidad glial), miembro 3
2	203645_s_at	CD163	NM_004244,	molécula CD163
3	215049_x_at		NM_203416	(receptor de hemoglobina-haptoglobina)
4	219840_s_at	TCL6	NM_012468,	leucemia/linfoma de células T
			NM_014418	
5	231994_at	CHDH	(AJ272267)	colina deshidrogenasa
6	239929_at		NM_152491 (carboxipeptidasa)	proteína hipotética (actividad FLJ32569)
7	242274_x_at	SLC25A42	NM_178526	familia del portador de solutos 25, miembro 42
8	232271_at	HNF4G	NM_004133	factor nuclear de hepatocitos 4, gamma
9	203222_s_at	TLE1	NM_005077 <i>Drosophila</i>	potenciador tipo transducina de homólogo de Split 1,
10	89977_at		NM_017888	proteína hipotética FLJ20581 (proceso metabólico)
11	242998_at	RDH12	NM_152443 cis)	retinol deshidrogenasa 12 (todo-trans/9-cis/11-
12	235964_x_at		(AA603344)	clon de ADNc IMAGE: 1117747
13	234219_at		(AK024998)	ADNc FLJ21345 fis
14	230179_at		(AK127555)	ADNc FLJ45648 fis
15	204438_at	MRC1	NM_002438	receptor de manosa, tipo C 1
		MRC1L1	NM_001009567	receptor de manosa, tipo C 1 similar a 1

ES 2 379 673 T3

16	201761_at	MTHFD2	NM_006636, NM_001040409	metilentetrahidrofolato deshidrogenasa (dependiente de NADP ⁺) 2, meteniltetrahidrofolato ciclohidrolasa, gen nuclear que codifica para proteína mitocondrial
17	219090_at	SLC24A3	NM_020689	familia del portador de solutos 24 (intercambiador de sodio/potasio/ calcio), miembro 3
18	219260_s_at	C17orf81	NM_015362,	marco de lectura abierto 81 del cromosoma 17
19	239983_at	SLC30A8	NM_173851	familia del portador de solutos 30 (transportador de zinc), miembro 8
20	201041_s_at	DUSP1	NM_004417	fosfatasa de especificidad dual 1
21	213519_s_at	LAMA2	NM_000426, NM_001079823	laminina, alfa 2 (merosina, distrofia muscular congénita)
22	205278_at	GAD1	NM_000817 GAD67	glutamato descarboxilasa 1, variante de transcrito
23	225662_at	ZAK	NM_133646	Motivo alfa estéril y cremallera de leucinas que contiene cinasa AZK, variante de transcrito 2
24	239161_at	FDX1	NM_004109	ferredoxina 1, gen nuclear que codifica para proteína mitocondrial
25	217762_s_at	RAB31	NM_006868	RAB31, miembro de la familia oncogénica RAS
26	230716_at		XM_379432	proteína hipotética LOC285733
27	236442_at	DPF3	NM_012074	D4, dedos de zinc y PHD doble, familia 3
28	207095_at	SLC10A2	NM_000452	familia del portador de solutos 10 (familia del cotransportador de ácido biliar/sodio), miembro 2
29	226142_at	GLIPR1	NM_006851	proteína 1 relacionada con patogénesis GLI
30	213817_at		(AL049435)	ADNc DKFZp586B0220
31	224357_s_at	MS4A4A NM_148975	NM_024021,	4-dominios que abarcan la membrana, subfamilia A, miembro 4
32	223582_at	GPR98 NR_003149	NM_032119,	receptor 98 acoplado a proteínas G

33	229554_at	LUM	NM_002345	lumicano, miembro de la familia de proteoglicanos ricos en leucina pequeños (SLRP)
----	-----------	-----	-----------	--

5 Por consiguiente, en un aspecto la invención se refiere al uso de una firma de reconocimiento que comprende uno o más de los genes mostrados en la tabla 1 para indicar rechazo de trasplantes, en particular rechazo por CAN de un órgano trasplantado, preferiblemente al menos 5, 10, 15, 20 ó 25 de los genes de la tabla 1 (las clasificaciones mostradas pueden usarse como orientación para los genes que son los más preferidos para incluir en la evaluación).

10 Los 33 conjuntos de sondas también se enumeran en la tabla 4 en la que se indica el cambio en veces en la expresión en relación con el control para CAN I, II y III. La tabla se clasifica sobre los resultados para CAN III. Genes preferidos cuyo perfil de expresión se analiza en los métodos de la invención (identificados mediante el conjunto de sondas Affymetrix indicado en la tabla 1 a partir del cual puede deducirse el nombre del gen) son: 203645_s_at, 215049_x_at, 229554_at, 235964_x_at, 202800 (regulados por incremento) y 242998_at, 219840_s_at, 239929_at, 223582_at y 205278_at (regulados por disminución). Se prefieren particularmente los genes correspondientes a los conjuntos de sondas 202800_at, 215049_x_at y 203645_s_at (es decir, SLC1A3 y CD163), y los genes correspondientes a los conjunto de sondas 219840_s_at y 239929_at (es decir, RDH12 y FLJ32569). Estos genes/conjunto de sondas preferidos pueden ser particularmente útiles para la detección de CAN III y/o distinguir CAN III de CAN I/CAN II y/o RA.

Características clínicas de CAN

20 La disfunción crónica de trasplantes es un fenómeno en trasplantes de órganos sólidos que presentan un deterioro gradual de la función del injerto de meses a años tras el trasplante, conduciendo en última instancia al fracaso del injerto, y que va acompañada por rasgos histológicos característicos. Clínicamente, la nefropatía de aloinjerto crónica en injertos de riñón (es decir, CAN) se manifiesta por sí misma como una disminución lentamente progresiva en la tasa de filtración glomerular, habitualmente junto con proteinuria e hipertensión arterial.

25 La característica histomorfológica esencial de CAN en todos los aloinjertos parenquimales es endarteritis fibroproliferativa. La lesión vascular afecta a toda la longitud de las arterias en un patrón irregular. Hay proliferación de la mioíntima concéntrica que da como resultado engrosamiento fibroso y el aspecto de “piel de cebolla” característico de la íntima en pequeñas arterias. Otros hallazgos incluyen hinchazón endotelial, acumulación de células espumosas, rotura de la lámina elástica interna, hialinosis y engrosamiento de la media, y presencia de macrófagos y linfocitos T subendoteliales. Además, se observa a menudo una inflamación perivascular focal persistente.

30 Además de los cambios vasculares, los riñones que experimentan CAN también muestran fibrosis intersticial, atrofia tubular y glomerulopatía. Se ha identificado la glomerulopatía de trasplante crónica (duplicación de las paredes capilares y aumento de la matriz mesangial) como una característica altamente específica de riñones con CAN. Lesiones menos específicas son colapso isquémico glomerular, atrofia tubular y fibrosis intersticial. Además, laminaciones y separación basal capilar peritubular están asociadas con la disminución tardía de la función del injerto. Los criterios para el diagnóstico histológico de CAN en aloinjertos de riñón están normalizados internacionalmente en el esquema de Banff 97 para patología de aloinjerto renal. La tabla 2 resume los criterios de Banff 97 para nefropatía de aloinjerto crónica/esclerosante (CAN) (Racusen *et al.*, 1999, *Kidney Int.* 55(2):713-23).

Grado	Hallazgos histopatológicos
I – leve	Atrofia tubular y fibrosis intersticial leve sin (a) o con (b) cambios específicos que sugieren rechazo crónico
II – moderado	Atrofia tubular y fibrosis intersticial moderada (a) o (b)
III - grave	Atrofia tubular y fibrosis intersticial grave y pérdida tubular (a) o (b)

40 Para Banff 97, una muestra “adecuada” se define como una biopsia con 10 o más glomérulos y al menos dos arterias. Se proponen dos hipótesis de trabajo para entender el proceso de CAN. El primer y probablemente el más importante conjunto de factores de riesgo se han agrupado con la designación de factores relacionados con rechazo o inmunológicos, “dependientes de aloantígenos”. Entre ellos, aparición tardía y aumento del número de episodios de rechazo agudo; edad del receptor más joven; no coincidencia de sexo masculino a femenino; un diagnóstico primario de hepatitis autoinmunitaria o enfermedad biliar; inmunosupresión inicial y origen étnico distinto de raza blanca del receptor se han asociados todos con un aumento del riesgo de desarrollar rechazo crónico. Más

específicamente, (a) histoincompatibilidad: la supervivencia del injerto a largo plazo parece estar fuertemente correlacionada con su grado de coincidencia de histocompatibilidad entre donante y receptor; (b) rechazos agudos: la aparición, frecuencia y gravedad de episodios de rechazo agudo son factores de riesgo independientes de CAN. El rechazo agudo es el factor de riesgo identificado más sistemáticamente para la aparición de CAN; (c) 5 inmunosupresión subóptima debido a dosis de mantenimiento demasiado baja de ciclosporina o no cumplimiento; y (d) anticuerpos específicos anti-donante: muchos estudios han mostrado que tras el trasplante, la mayoría de los pacientes producen anticuerpos. El segundo conjunto de factores de riesgo que se denomina factores de riesgo “no dependientes de aloantígenos” o “no inmunológicos” y que también contribuyen al desarrollo de rechazo crónico incluyen edad avanzada del donante, aterosclerosis preexistente en el órgano del donante y tiempo de isquemia fría 10 prolongado. Respuestas no aloinmunitarias a la enfermedad y lesión, tales como isquemia, pueden provocar o agravar CAN. Más específicamente, (a) recaída de la enfermedad original, tal como glomerulonefritis; (b) consecuencia de la lesión quirúrgica tras el trasplante; (c) duración de la isquemia: la hiperplasia de la íntima se correlaciona con la duración de la isquemia; (d) injertos de riñón de cadáveres frente a los procedentes de donantes vivos emparentados y no emparentados; (e) infecciones virales: la infección por CMV afecta directamente a moléculas de adhesión intercelular tales como ICAM-1; (f) hiperlipidemia; (g) hipertensión; (h) edad; (i) sexo: la 15 aparición de arterosclerosis por trasplante era más temprana en hombres que en mujeres; (j) origen étnico; y (k) la cantidad de tejido funcional - número reducido de nefronas e hiperfiltración.

Limitaciones de los enfoques clínicos actuales para el diagnóstico de CAN

La diferenciación del diagnóstico de rechazo, por ejemplo, CAN, de otras etiologías para disfunción del injerto y la 20 institución de una terapia eficaz es un proceso complejo debido a: (a) la biopsia de injertos con aguja gruesa percutánea, la mejor de las herramientas actuales disponibles para diagnosticar el rechazo se realiza habitualmente tras el “hecho”, es decir, la disfunción del injerto y el daño del injerto (irreversible en algunos casos) ya están presentes, (b) el análisis morfológico del injerto proporciona pistas modestas con respecto a la posibilidad de revertir un episodio de rechazo dado, y pistas mínimas referentes a la probabilidad de recaída (“rebote”), y (c) la base 25 mecanística del fenómeno de rechazo, un requisito previo para el diseño de estrategias terapéuticas, está escasamente definida por los índices de diagnóstico actuales, incluyendo características morfológicas de rechazo..

El diagnóstico de, por ejemplo, rechazo de aloinjerto renal se realiza habitualmente por el desarrollo de la disfunción de injerto (por ejemplo, un aumento en la concentración de creatinina sérica) y pruebas morfológicas de lesión del injerto en zonas del injerto que también manifiestan infiltración de células mononucleares. Sin embargo, se aplican 30 dos advertencias al uso de la función renal anómala como indicador del proceso de rechazo: en primer lugar, el deterioro de la función renal no siempre está disponible como pista clínica para diagnosticar el rechazo puesto que muchos de los injertos renales cadavéricos padecen insuficiencia renal aguda (reversible) en el periodo tras el trasplante inmediato debido a lesión por los procedimientos de recogida y conservación *ex vivo*. En segundo lugar, incluso cuando está presente función renal inmediatamente intacta, podría desarrollarse disfunción del injerto debida 35 a una causa no inmunológica, tal como la propia terapia inmunosupresora.

Por ejemplo, la nefrotoxicidad por ciclosporina (CsA), una complicación que no se identifica fácilmente basándose únicamente en las concentraciones plasmáticas/sanguíneas de CsA, es una complicación común. La importancia 40 clínica de distinguir el rechazo de la nefrotoxicidad por CsA no puede exagerarse, puesto que las estrategias terapéuticas son diametralmente opuestas: el aumento escalonado de los inmunosupresores para el rechazo, y la reducción de la dosificación de CsA para la nefrotoxicidad.

La invención se basa, en parte, en el hallazgo de que el aumento o la disminución de la expresión de uno o más genes y/o las proteínas codificadas puede asociarse de manera fiable con ciertos estados de rechazo de injertos. Por tanto, como resultado de los datos descritos en el presente documento, están ahora disponibles métodos para el 45 diagnóstico rápido y fiable de rechazo agudo y crónico, incluso en casos en los que las biopsias de aloinjertos muestran sólo infiltrados celulares leves. Se describe en el presente documento un análisis de genes que se modulan (por ejemplo, regulan por incremento o regulan por disminución) simultáneamente y que proporcionan una firma molecular para detectar de manera exacta el rechazo de trasplantes y/o el grado de la gravedad o progresión del rechazo de trasplantes.

La descripción proporciona además métodos moleculares clásicos y métodos a gran escala para medir la expresión de genes biomarcadores adecuados. Los métodos descritos en el presente documento son particularmente útiles 50 para detectar el rechazo crónico de trasplantes y preferiblemente rechazo crónico de trasplantes temprano. En una realización, el rechazo crónico de trasplantes es el resultado de CAN. Los más normalmente, el sujeto (es decir, el receptor de un trasplante) es un mamífero tal como un ser humano. El órgano trasplantado puede incluir cualquier órgano o tejido trasplantable, por ejemplo riñón, corazón, pulmón, hígado, páncreas, hueso, médula ósea, intestino, 55 nervios, células madre (o células derivadas de células madre), componentes tisulares y materiales compuestos tisulares. En una realización preferida, el trasplante es un trasplante de riñón.

Los métodos descritos en el presente documento son útiles para evaluar la eficacia de la terapia anti-rechazo. Tales métodos implican comparar el nivel antes de la administración (por ejemplo, magnitud) de los transcritos de los genes biomarcadores con el nivel tras la administración (por ejemplo, magnitud) de los transcritos de los mismos genes, en los que un nivel tras la administración (por ejemplo, magnitud) de los transcritos de los genes que es 60

inferior al nivel antes de la administración (por ejemplo, magnitud) de los transcritos de los mismos genes indica la eficacia de la terapia anti-rechazo. Cualquier candidato para la prevención y/o el tratamiento del rechazo de trasplantes, (tal como fármacos, anticuerpos u otras formas de rechazo o prevención) pueden seleccionarse mediante la comparación del nivel (por ejemplo, magnitud) de expresión de biomarcador antes y después de la exposición al candidato. Además, puede obtenerse información valiosa de esta manera para ayudar en la determinación del futuro manejo clínico del sujeto de cuyo material biológico se está realizando la evaluación. La evaluación puede realizarse usando una muestra del sujeto, usando los métodos descritos en el presente documento para determinar el nivel (por ejemplo, magnitud) de expresión génica de los genes biomarcadores. El análisis puede comprender además la detección de un agente infeccioso.

5 Debe apreciarse que la presente invención proporciona métodos en los que se mide el nivel (por ejemplo, magnitud) de expresión de biomarcadores de CAN y que a partir de estas mediciones puede derivarse un patrón de expresión de biomarcadores de CAN que también es útil en métodos seleccionados de la presente invención.

Detección de la expresión génica

15 En ciertos aspectos de la presente descripción, el nivel (por ejemplo, magnitud) de expresión se determina para uno o más genes biomarcadores en la muestra obtenida de un sujeto. La muestra puede comprender células obtenidas del sujeto, tal como de una biopsia de injerto. Otras muestras incluyen, pero no se limitan a muestras de líquidos tales como sangre, plasma, suero, linfa, CSF, líquido quístico, ascitis, orina, heces y bilis. La muestra también puede obtenerse a partir de líquido de lavado broncoalveolar, líquido pleural o líquido peritoneal, o cualquier otro líquido secretado o excretado por un aloinjerto que funciona de manera normal o anómala, o cualquier otro líquido resultante de la exudación o transudación a través de un aloinjerto o en proximidad anatómica a un aloinjerto, o cualquier líquido en la comunicación de fluido con el aloinjerto.

Los individuos que han tenido un trasplante de riñón normalmente se presentarán para las pruebas como resultado de experimentar uno o más síntomas que pueden indicar la aparición de rechazo del órgano trasplantado. Esto puede producirse en cualquier estadio tras haberse realizado el trasplante.

25 Se conocen en la técnica muchos métodos diferentes para medir la expresión génica. Los métodos clásicos incluyen RT-PCR cuantitativa, transferencias de tipo Northern y ensayos de protección de ribonucleasa. Ciertos ejemplos descritos en el presente documento usan (RT)-PCR con transcripción inversa competitiva para medir el nivel (por ejemplo, magnitud) de expresión de genes marcadores. Tales métodos pueden usarse para examinar la expresión de genes del sujeto así como agrupaciones de genes enteros. Sin embargo, a medida que el número de genes que van a examinarse aumenta, el tiempo y los costes pueden convertirse en engorrosos.

30 Los métodos de detección a gran escala permiten análisis más rápidos, menos caros de los niveles de expresión de muchos genes simultáneamente. Tales métodos implican normalmente un alineamiento ordenado de sondas fijadas a un sustrato sólido. Cada sonda puede hibridar con un conjunto diferente de ácidos nucleicos. En un método, se generan sondas amplificando o sintetizando una parte sustancial de las regiones codificantes de diversos genes de interés. Entonces, se colocan estos genes sobre un soporte sólido. Entonces, se obtienen muestras de ARNm, se convierten en ADNc, se amplifican y se marcan (habitualmente con un marcador de fluorescencia). Entonces se aplican los ADNc marcados al alineamiento, y se hibridan ADNc con sus respectivas sondas de una manera que está relacionada linealmente con su concentración. La detección del marcador permite la medición de la cantidad de cada ADNc adherido al alineamiento.

40 Se conocen bien en la técnica muchos métodos para realizar tales experimentos de alineamientos de ADN. Se describen a continuación métodos a modo de ejemplo pero no pretenden ser limitativos. Se conocen en la técnica microalineamientos y consisten en una superficie a la que se unen sondas que corresponden en secuencia a productos génicos (por ejemplo, ADNc, ARNm, oligonucleótidos) en posiciones conocidas. En una realización, el microalineamiento es un alineamiento (es decir, una matriz) en el que cada posición representa un sitio de unión diferenciado para un producto codificado por un gen (por ejemplo, una proteína o ARN), y en el que están presentes sitios de unión para productos de la mayoría o casi todos los genes en el genoma del organismo. En una realización preferida, el "sitio de unión" (a continuación en el presente documento, "sitio") es un ácido nucleico o derivado de ácido nucleico con el que un ADNc relacionado particular puede hibridar específicamente. El ácido nucleico o derivado del sitio de unión puede ser, por ejemplo, un oligómero sintético, un ADNc de longitud completa, un ADNc menor que la longitud completa o un fragmento de gen.

45 Habitualmente, el microalineamiento tendrá sitios de unión que corresponden a al menos 100 genes y más preferiblemente 500, 1000, 4000 o más. En ciertas realizaciones, los alineamientos más preferidos tendrán aproximadamente el 98-100% de los genes de un organismo particular representado. En otras realizaciones, pueden usarse microalineamientos adaptados que tienen sitios de unión que corresponden a menos genes específicamente seleccionados. En ciertas realizaciones, los microalineamientos adaptados comprenden sitios de unión para menos de 4000, menos de 1000, menos de 200 o menos de 50 genes, y comprenden sitios de unión para al menos 2, preferiblemente al menos 3, 4, 5 o más genes de cualquiera de los biomarcadores de la tabla 1. Preferiblemente, el microalineamiento tiene sitios de unión para genes relevantes para someter a prueba y confirmar un modelo de red biológica de interés.

Los ácidos nucleicos que van a ponerse en contacto con el microalineamiento pueden prepararse de una variedad de modos. Se conocen bien métodos para preparar ARN poli(A)+ y total y se describen generalmente en Sambrook *et al.*, citado anteriormente. Se prepara el ADNc marcado a partir de ARNm mediante transcripción inversa cebada al azar o cebada con oligo dT, ambas de las cuales se conocen bien en la técnica (véase por ejemplo, Klug and Berger, 1987, *Methods Enzymol.* 152: 316-325). La transcripción inversa puede llevarse a cabo en presencia de un dNTP conjugado con un marcador detectable, lo más preferiblemente un dNTP marcado de manera fluorescente. Alternativamente, el ARNm aislado puede convertirse en ARN antisentido marcado sintetizado mediante transcripción *in vitro* de ADNc bicatenario en presencia de dNTP marcados (Lockhart *et al.*, 1996, *Nature Biotech.* 14: 1675). Los ADNc o ARN pueden sintetizarse en ausencia de marcador detectable y pueden marcarse posteriormente, por ejemplo, incorporando dNTP o rNTP biotinilados, o algunos medios similares (por ejemplo, fotorreticulando un derivado de psoraleno de biotina con ARN), seguido por adición de estreptavidina marcada (por ejemplo, estreptavidina conjugada con ficoeritrina) o el equivalente.

Cuando se usan marcadores fluorescentes, se conocen muchos fluoróforos adecuados, incluyendo fluoresceína, lisamina, ficoeritrina, rodamina (Perkin Elmer Cetus), Cy2, Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy5,5, Cy7, FluorX (Amersham) y otros (véase, por ejemplo, Kricka, 1992, Academic Press San Diego, Calif.).

En otra realización, se usa un marcador distinto de un marcador fluorescente. Por ejemplo, puede usarse un marcador radiactivo o un par de marcadores radiactivos con distintos espectros de emisión. Sin embargo, el uso de radioisótopos es una realización menos preferida.

Se eligen las condiciones de hibridación y lavado del ácido nucleico de manera que la población de ácidos nucleicos marcados hibridará específicamente con ácidos nucleicos complementarios apropiados, fijados a la matriz. Tal como se usa en el presente documento, una secuencia de polinucleótidos se considera complementaria a otra cuando, si el más corto de los polinucleótidos es menor o igual a 25 bases, no existen apareamientos erróneos usando las reglas de apareamiento de bases convencionales o, si el más corto de los polinucleótidos es mayor de 25 bases, no existe más de un 5% de apareamiento erróneo.

Las condiciones de hibridación óptimas dependerán de la longitud (por ejemplo, oligómero frente a polinucleótido mayor de 200 bases) y tipo (por ejemplo, ARN, ADN, PNA) de ácidos nucleicos marcados y polinucleótido u oligonucleótido inmovilizado. Se describen parámetros generales para condiciones de hibridación específicas (es decir, rigurosas) para ácidos nucleicos en Sambrook *et al.*, citado anteriormente, y en Ausubel *et al.*, 1987, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, que se incorpora en su totalidad para todos los fines. La unión no específica de los ácidos nucleicos marcados con el alineamiento puede disminuirse tratando el alineamiento con una gran cantidad de ADN no específico, una denominada etapa de "bloqueo".

Cuando se usan sondas marcadas fluorescentemente, las emisiones de fluorescencia en cada sitio de un alineamiento de transcritos puede detectarse, preferiblemente, mediante microscopía láser confocal de barrido. Cuando se usan dos fluoróforos, se lleva a cabo un barrido separado, usando la línea de excitación apropiada, para cada uno de los dos fluoróforos usados. Alternativamente, puede usarse un láser que permite la iluminación de la muestra simultánea a longitudes de onda específicas para los dos fluoróforos y puede analizarse simultáneamente las emisiones de los dos fluoróforos (véase Shalon *et al.*, 1996, *Genome Research* 6:639-645). En una realización preferida, se exploran los alineamientos con un escáner fluorescente láser con una platina X-Y controlada por ordenador y un objetivo de microscopio. La excitación secuencial de los dos fluoróforos se logra con un láser de gases mixtos de múltiples líneas y se separa la luz emitida por longitud de onda y se detecta con dos tubos fotomultiplicadores. Se describen dispositivos de exploración láser de fluorescencia en Schena *et al.*, 1996, *Genome Res.* 6:639-645 y en otras referencias citadas en el presente documento. Alternativamente, puede usarse el haz de fibra óptica descrito por Ferguson *et al.*, 1996, *Nature Biotech.* 14:1681-1684, para monitorizar los niveles de abundancia de ARNm en un gran número de sitios simultáneamente. Están disponibles comercialmente escáneres de microalineamientos fluorescentes de Affymetrix, Packard BioChip Technologies, BioRobotics y muchos otros proveedores.

Se registran las señales, se cuantifican y se analizan usando una variedad de software informático. En una realización, se eliminan las manchas de la imagen escaneada usando un programa gráfico (por ejemplo, Hijaak Graphics Suite) y entonces se analiza usando un programa de reticulación de imágenes que crea una hoja de cálculo de la hibridación promedio a cada longitud de onda en cada sitio. Si es necesario, puede realizarse una corrección determinada experimentalmente para la "interferencia" (o solapamiento) entre los canales para los dos fluoróforos. Para cualquier sitio de hibridación particular en el alineamiento de transcritos, se calcula preferiblemente una razón de la emisión de los dos fluoróforos. La razón es independiente del nivel de expresión absoluto del gen relacionado, pero es útil para genes cuya expresión se modula significativamente mediante administración de fármacos, delección de genes o cualquier otro acontecimiento sometido a prueba.

En una realización, se preparan alineamientos de transcritos que reflejan el estado transcripcional de una célula de interés hibridando una mezcla de dos conjuntos marcados de manera diferente de ADNc con el microalineamiento. Una célula es una célula de interés mientras que la otra se usa como control de normalización. La hibridación relativa del ADNc de cada célula con el microalineamiento refleja entonces la expresión relativa de cada gen en las

dos células.

5 No es siempre necesario medir los niveles de expresión en una célula control al mismo tiempo que la célula de interés. Las mediciones pueden compararse frente a un conjunto de controles patrón. Normalmente, los controles patrón incluyen los niveles de expresión de un gen de mantenimiento ("*house keeping*"), tal como actina, de manera que los resultados para la muestra de interés pueden ajustarse a los del control para tener en cuenta las diferencias en las condiciones de ensayo, los niveles del fondo etc.

10 El resultado final es normalmente un conjunto de valores de la expresión relativa de los genes marcadores en la muestra de interés en comparación con un control (por ejemplo ascendente o descendente y la magnitud de cambio expresada en, por ejemplo, términos de porcentaje o como un múltiplo). Este conjunto de valores relativos se denomina "perfil de expresión diferencial" y generalmente se usa como base para el diagnóstico/la clasificación posterior. Entonces, se compara normalmente el perfil de expresión diferencial con un perfil de expresión diferencial de referencia que caracteriza uno o más estadios/grados de CAN. Por ejemplo, puede usarse un único perfil de expresión diferencial de referencia que es indicativo de cualquier estadio de CAN. Alternativamente, o además, un perfil de expresión diferencial de referencia que es específico para uno o más estadios, pero no todos los estadios, o CAN, por ejemplo un perfil para el estadio III y un perfil diferente para los estadios I y II. Puesto que se espera algo de variación, puede usarse análisis estadístico para determinar si un perfil de interés está suficientemente cerca del perfil de referencia para que se encuentre una coincidencia estadísticamente significativa.

20 En algunas realizaciones, los niveles de expresión de biomarcadores en diferentes muestras y condiciones pueden compararse usando una variedad de métodos estadísticos. Está disponible una variedad de métodos estadísticos para evaluar el grado de relación en patrones de expresión de diferentes genes. Los métodos estadísticos pueden dividirse en dos partes relacionadas: métricas para determinar la relación del patrón de expresión de uno o más genes, y métodos de agrupamiento, para organizar y clasificar los datos de expresión basados en una métrica adecuada (Sherlock, 2000, Curr. Opin. Immunol. 12:201-205; Butte *et al.*, 2000, Pacific Symposium on Biocomputing, Hawaii, World Scientific, pág. 418-29).

25 En una realización, puede usarse la correlación de Pearson como métrica. En resumen, para un gen dado, cada punto de datos del nivel de expresión génica define un vector que describe la desviación de la expresión génica de la media global del nivel de expresión génica para ese en todas las condiciones. Entonces puede considerarse el patrón de expresión de cada gen como una serie de vectores positivos y negativos. Entonces puede calcularse un coeficiente de correlación de Pearson comparando los vectores de cada gen entre sí. Un ejemplo de un método de este tipo se describe en Eisen *et al.* (1998, citado anteriormente). Los coeficientes de correlación de Pearson representan la dirección de los vectores, pero no las magnitudes.

30 En otra realización, pueden usarse mediciones de distancia euclídea como métrica. En estos métodos, se calculan vectores para cada gen en cada condición y se comparan basándose en la distancia absoluta en el espacio multidimensional entre los puntos descritos por los vectores para el gen. En otra realización, se usaron tanto la distancia euclídea como el coeficiente de correlación en la agrupación.

35 En una realización adicional, la relación de los patrones de expresión génica puede determinarse mediante cálculos entrópicos (Butte *et al.* 2000, citado anteriormente). Se calcula la entropía para cada patrón de expresión del gen. Entonces se compara la entropía calculada para dos genes para determinar la información mutua. Se calcula la información mutua restando la entropía de los patrones de expresión génica conjuntos de la entropía calculada para cada gen individualmente. Cuanto más diferentes sean dos patrones de expresión génica, mayor será la entropía conjunta y menor la información mutua calculada. Por tanto, una alta información mutua indica una relación no aleatoria entre los dos patrones de expresión.

40 En otra realización, pueden usarse los métodos de agrupación aglomerativos para identificar agrupaciones génicas. En una realización, se determinan los coeficientes de correlación de Pearson o métricas euclídeas para cada gen y entonces se usan como base para formar un dendrograma. En un ejemplo, se exploran los genes para determinar pares de genes con el coeficiente de correlación más cercano. Entonces se colocan estos genes en dos ramas de un dendrograma conectadas por un nodo, con la distancia entre la profundidad de las ramas proporcional al grado de correlación. Este procedimiento continúa, añadiendo progresivamente ramas al árbol. En última instancia se forma un árbol en el que genes conectados por ramas cortas representan agrupaciones, mientras que genes conectados por ramas más largas representan genes que no están agrupados juntos. También pueden usarse los puntos en el espacio multidimensional mediante las métricas euclídeas para generar dendrogramas.

45 En otra realización, pueden usarse métodos de agrupación divisivos. Por ejemplo, se asignan vectores al patrón de expresión de cada gen, y se generan dos vectores al azar. Entonces se asigna cada gen a uno de los dos vectores al azar basándose en la probabilidad de coincidir con ese vector. Se recalculan iterativamente los vectores al azar para generar dos centroides que dividen los genes en dos grupos. Esta división forma la rama principal en la parte inferior de un dendrograma. Entonces se divide adicionalmente cada grupo de la misma manera, produciendo en última instancia un dendrograma ramificado completo.

55 En una realización adicional, pueden usarse mapas autoorganizativos (SOM) para generar agrupaciones. En

- 5 general, se representan gráficamente los patrones de expresión génica en el espacio n-dimensional, usando una métrica tal como las métricas euclídeas descritas anteriormente. Entonces se coloca una rejilla de centroides sobre el espacio n-dimensional y se deja que los centroides migren hacia las agrupaciones de puntos, que representan agrupaciones de expresión génica. Finalmente, los centroides representan un patrón de expresión génica que es una clase de promedio de una agrupación génica. En ciertas realizaciones, pueden usarse SOM para generar centroides, y los genes agrupados en cada centroide pueden representarse adicionalmente mediante un dendrograma. Se describe un método a modo de ejemplo en Tamayo *et al.*, 1999, PNAS 96:2907-12. Una vez formados los centroides, debe evaluarse la correlación mediante uno de los métodos descritos citados anteriormente.
- 10 En otra realización, puede usarse análisis multivariado PLSDA, OPLS y OSC como medios de clasificación.
- 15 En otro aspecto, la descripción proporciona un conjunto de sondas. Se diseñan conjuntos de sondas preferidos para detectar la expresión de uno o más genes y proporcionar información sobre el estado de un injerto. Los conjuntos de sondas preferidos de la descripción comprenden sondas que son útiles para la detección de al menos dos genes que pertenecen a cualquiera de los genes biomarcadores de la tabla 1. Los conjuntos de sondas de la descripción comprenden sondas útiles para la detección de no más de 10.000 transcritos génicos, y los conjuntos de sondas preferidos comprenderán sondas útiles para la detección de menos de 4000, menos de 1000, menos de 200, menos de 100, menos de 90, menos de 80, menos de 70, menos de 60, menos de 50, menos de 40, menos de 30, menos de 20, menos de 10 transcritos génicos. Los conjuntos de sondas de la descripción se seleccionan como diana en la detección de transcritos génicos que son informativos sobre el estado del trasplante. Los conjuntos de sondas de la descripción también pueden comprender un número de sondas grande o pequeño que detectan transcritos génicos que no son informativos sobre el estado del trasplante. En realizaciones preferidas, los conjuntos de sondas de la descripción se fijan a un sustrato sólido para formar un alineamiento de sondas. Se prevé que los conjuntos de sondas también pueden ser útiles para PCR múltiple. Las sondas de conjuntos de sondas pueden ser ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN, formas químicamente modificadas de ADN y ARN), o PMA, o cualquier otro compuesto polimérico que pueda interactuar específicamente con las secuencias de ácido nucleico deseadas.
- 20 También se proporcionan medios legibles por ordenador que comprenden biomarcador(es) de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, "medios legibles por ordenador" incluyen un medio que puede leerse y al que puede accederse directamente mediante un ordenador. Tales medios incluyen, pero no se limitan a: medios de almacenamiento magnético, tales como disquetes, medios de almacenamiento en disco duro, y cinta magnética;
- 25 30 medios de almacenamiento óptico tales como CD-ROM; medios de almacenamiento eléctrico tales como RAM y ROM; e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento óptico/magnético. El experto apreciará fácilmente cómo cualquiera de los medios legibles por ordenador conocidos actualmente puede usarse para crear una manufactura que comprende un medio legible por ordenador que tiene grabado sobre el mismo un biomarcador de la presente descripción
- 35 Tal como se usa en el presente documento, "grabado" incluye un procedimiento para almacenar información en el medio legible por ordenador. Los expertos en la técnica pueden adoptar fácilmente cualquiera de los métodos conocidos actualmente para grabar información en el medio legible por ordenador para generar manufacturas que comprenden los biomarcadores de la presente descripción.
- 40 Puede usarse una variedad de formatos y programas de procesadores de datos para almacenar la información de biomarcadores de la presente descripción en el medio legible por ordenador. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que corresponde a los biomarcadores puede representarse en un archivo de texto de procesamiento de palabras, formatearse en software disponible comercialmente tal como WordPerfect y MicroSoft Word, o representarse en forma de un archivo ASCII, almacenarse en una aplicación de base de datos, tal como DB2, Sybase, Oracle o similares. Puede adaptarse cualquier número de formatos de estructuración de procesadores de datos (por ejemplo, archivo de texto o base de datos) con el fin de obtener un medio legible por ordenador que tiene grabado sobre el mismo los biomarcadores de la presente descripción.
- 45 Al proporcionar los biomarcadores de la descripción en una forma legible por ordenador, puede accederse de manera rutinaria a la información de secuencias de biomarcadores para una variedad de fines. Por ejemplo, un experto en la técnica puede usar las secuencias de nucleótidos o aminoácidos de la descripción en una forma legible por ordenador para comparar una secuencia diana o motivo estructural diana con la información de secuencia almacenada dentro de los medios de almacenamiento de datos. Se usan medios de búsqueda para identificar fragmentos o regiones de las secuencias de la descripción que coinciden con una secuencia diana particular o motivo diana.
- 50 La descripción también incluye un alineamiento que comprende biomarcador(es) de la presente invención. El alineamiento puede usarse para evaluar la expresión de uno o más genes en el alineamiento. En una realización, el alineamiento puede usarse para evaluar la expresión génica en un tejido para determinar la especificidad de tejido de genes en el alineamiento. De esta manera, hasta aproximadamente 8600 genes pueden evaluarse simultáneamente para determinar la expresión. Esto permite que se desarrolle un perfil que muestra una batería de genes específicamente expresados en uno o más tejidos.
- 55

Además de tal determinación cualitativa, la descripción permite la cuantificación de la expresión génica. Por tanto, puede determinarse no sólo la especificidad de tejido, sino también el nivel de expresión de una batería de genes en el tejido. Por tanto, los genes pueden agruparse basándose en su expresión de tejido *per se* y el nivel de expresión en ese tejido. Esto es útil, por ejemplo, en la determinación de la relación de la expresión génica entre tejidos. Por tanto, un tejido puede estar alterado y puede determinarse el efecto sobre la expresión génica en un segundo tejido. En este contexto, puede determinarse el efecto de un tipo de célula sobre otro tipo de célula en respuesta a un estímulo biológico. Una determinación de este tipo es útil, por ejemplo, para conocer el efecto de la interacción célula-célula al nivel de la expresión génica. Si se administra terapéuticamente un agente para tratar un tipo de célula pero tiene un efecto no deseado sobre otro tipo de célula, la descripción proporciona un ensayo para determinar la base molecular del efecto no deseado y proporciona así la oportunidad de coadministrar un agente que contrarresta o trata de otra manera el efecto no deseado. De manera similar, incluso dentro de un único tipo de célula, pueden determinarse efectos biológicos no deseados al nivel molecular. Por tanto, pueden determinarse los efectos de un agente sobre la expresión de otro gen diana y contrarrestarse.

En otra realización, el alineamiento puede usarse para monitorizar el transcurso de tiempo de la expresión de uno o más genes en el alineamiento. Esto puede producirse en diversos contextos biológicos, tal como se da a conocer en el presente documento, por ejemplo el desarrollo y la diferenciación, la progresión de la enfermedad, procesos *in vitro*, tales como transformación celular y senescencia, procesos neurológicos y neurales autónomos, tales como, por ejemplo, dolor y apetito, y funciones cognitivas, tales como aprendizaje o memoria.

El alineamiento también es útil para determinar el efecto de la expresión de un gen sobre la expresión de otros genes en la misma célula o en células diferentes. Esto proporciona, por ejemplo, una selección de dianas moleculares alternativas para la intervención terapéutica si no puede regularse la diana final o aguas abajo.

El alineamiento también es útil para determinar los patrones de expresión diferencial de uno o más genes en células normales y enfermas. Esto proporciona una batería de genes que podrían servir como diana molecular para el diagnóstico o la intervención terapéutica.

25 Proteínas

Se prevé adicionalmente que niveles aumentados de ciertas proteínas también pueden proporcionar información de diagnóstico sobre trasplantes. En ciertas realizaciones, pueden detectarse una o más proteínas codificadas por genes de la tabla 1, y pueden usarse los niveles de proteínas elevados o disminuidos para diagnosticar el rechazo de injertos. En una realización preferida, se detectan los niveles de proteínas en una muestra de líquido tras el trasplante, y en una realización particularmente preferida, la muestra de líquido es orina o sangre periférica. En otra realización preferida, se detectan los niveles de proteína en una biopsia de injerto.

En vista de esta memoria descriptiva, se conocen bien en la técnica métodos para detectar proteínas. Los ejemplos de tales métodos incluyen inmunotransferencia de tipo Western, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), electroforesis uni y bidimensional, espectroscopía de masas y detección de la actividad enzimática. Los anticuerpos adecuados pueden incluir anticuerpos policlonales, monoclonales, fragmentos (tales como fragmentos Fab), anticuerpos de cadena sencilla y otras formas de moléculas de unión específica.

Medicina predictiva

La presente descripción se refiere al campo de la medicina predictiva en la que se usan ensayos de diagnóstico, ensayos de pronóstico, farmacogenética y ensayos clínicos de monitorización para fines de pronóstico (predictivos) para diagnosticar de ese modo y tratar a un sujeto profilácticamente. Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a ensayos de diagnóstico para determinar la expresión de ácidos nucleicos y/o proteínas biomarcadoras a partir de una muestra (por ejemplo, sangre, suero, células y tejido) para determinar de ese modo si es probable que un sujeto rechace un trasplante.

Otro aspecto de la descripción se refiere a monitorizar la influencia de agentes (por ejemplo, fármacos, compuestos) sobre la expresión o actividad de biomarcador en ensayos clínicos tal como se describe en detalle adicional en las siguientes secciones.

Un método a modo de ejemplo para detectar la presencia o ausencia de proteína biomarcadora o genes de la descripción en una muestra implica obtener una muestra a partir de un sujeto de prueba y poner en contacto la muestra con un compuesto o un agente que puede detectar la proteína o el ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, ADN genómico) que codifica para la proteína biomarcadora de manera que se detecta en la muestra la presencia de la proteína biomarcadora o el ácido nucleico. Un agente preferido para detectar ARNm o ADN genómico correspondiente a una proteína o gen biomarcador de la descripción es una sonda de ácido nucleico marcada que puede hibridar con un ARNm o ADN genómico de la invención. Se describen en el presente documento sondas adecuadas para su uso en los ensayos de diagnóstico de la invención.

Un agente preferido para detectar una proteína biomarcadora es un anticuerpo que puede unirse a una proteína biomarcadora, preferiblemente un anticuerpo con un marcador detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales o, más preferiblemente, monoclonales. Puede usarse un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo,

Fab o F(ab')₂). El término “marcado”, con respecto a la sonda o el anticuerpo, pretende abarcar el marcaje directo de la sonda o anticuerpo mediante acoplamiento (es decir, uniendo físicamente) una sustancia detectable a la sonda o el anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o el anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que está directamente marcado. Los ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado de manera fluorescente y el marcaje de extremos de una sonda de ADN con biotina de manera que puede detectarse con estreptavidina marcada de manera fluorescente. El término “muestra” pretende incluir tejidos, células y líquidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y líquidos presentes dentro de un sujeto. Es decir, el método de detección de la invención puede usarse para detectar ADN genómico, proteína o ARNm biomarcador en una muestra tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm biomarcador incluyen hibridaciones de tipo Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de proteína biomarcadora incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunotransferencias de tipo Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de ADN genómico biomarcador incluyen hibridaciones de tipo Southern. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de proteína biomarcadora incluyen introducir, en un sujeto, un anticuerpo biomarcador marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un biomarcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto puede detectarse mediante técnicas de obtención de imágenes convencionales.

En una realización, la muestra contiene moléculas de proteína del sujeto de prueba. Alternativamente, la muestra puede contener moléculas de ARNm del sujeto de prueba o moléculas de ADN genómico del sujeto de prueba. Una muestra preferida es una muestra de suero aislada por medios convencionales a partir de un sujeto.

Los métodos implican además obtener una muestra de control (por ejemplo, biopsias de un riñón sano no trasplantado o de un riñón sano no trasplantado que no muestra signos de rechazo) a partir de un sujeto de control, poner en contacto la muestra de control con un compuesto o agente que puede detectar ADN genómico, ARNm o proteína biomarcadora, de manera que se detecta la presencia de ADN genómico, ARNm o proteína biomarcadora en la muestra, y comparar la presencia de ADN genómico, ARNm o proteína biomarcadora en la muestra de control con la presencia de ADN genómico, ARNm o proteína biomarcadora en la muestra de prueba.

La descripción también abarca kits para detectar la presencia de biomarcador en una muestra. Por ejemplo, el kit puede comprender un agente o compuesto marcado que puede detectar ARNm o proteína biomarcadora en una muestra; medios para determinar la cantidad de biomarcador en la muestra; y medios para comparar la cantidad de biomarcador en la muestra con un patrón. El compuesto o agente puede envasarse en un recipiente adecuado. El kit puede comprender además instrucciones para usar el kit para detectar el ácido nucleico o proteína biomarcadora.

Los métodos de diagnóstico descritos en el presente documento pueden utilizarse además para identificar sujetos que tienen o corren el riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con actividad o expresión de biomarcadores aberrante. Tal como se usa en el presente documento, el término “aberrante” incluye una actividad o expresión de biomarcadores que se desvía de la actividad o expresión de biomarcadores de tipo natural. La actividad o expresión aberrante incluye aumento o disminución de la expresión o actividad, así como expresión o actividad que no sigue el patrón de expresión del desarrollo de tipo natural o el patrón de expresión subcelular. Por ejemplo, la actividad o expresión de biomarcadores aberrante pretende incluir los casos en los que una mutación en el gen biomarcador provoca que el gen biomarcador se subexpresa o se sobreexpresa y situaciones en las que tales mutaciones dan como resultado una proteína biomarcadora no funcional o una proteína que no funciona de un modo de tipo natural, por ejemplo, una proteína que no interacciona con un ligando de biomarcador o una que interacciona con un ligando de proteína no biomarcadora.

Además, los ensayos de pronóstico descritos en el presente documento pueden usarse para determinar si puede administrarse un agente a un sujeto (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro candidato a fármaco) para reducir el riesgo de rechazo, por ejemplo, ciclosporina. Por tanto, la presente invención proporciona métodos para determinar si un sujeto puede tratarse eficazmente con un agente para un trastorno asociado con aumento de la actividad o expresión génica de la combinación de genes de la tabla 1.

La monitorización de la influencia de agentes (por ejemplo, fármacos) sobre la expresión o actividad de un gen puede aplicarse no sólo en la selección de fármacos básica, sino también en ensayos clínicos. Por ejemplo, la eficacia de un agente que se determina mediante un ensayo de selección tal como se describe en el presente documento que aumenta la expresión génica, los niveles de proteína o que regula por incremento la actividad, puede monitorizarse en ensayos clínicos de sujetos que presentan al examinar la firma molecular y cualquier cambio en la firma molecular durante el tratamiento con un agente.

Por ejemplo, y no a modo de limitación, pueden identificarse genes y sus proteínas codificadas que se modulan en células mediante tratamiento con un agente (por ejemplo, compuesto, fármaco o molécula pequeña) que modula la actividad génica. En un ensayo clínico, pueden aislarse células y prepararse ARN y analizarse para determinar los niveles de expresión de genes implicados asociados con rechazo. Los niveles de expresión génica (por ejemplo, un patrón de expresión génica) pueden cuantificarse mediante análisis de transferencia de tipo Northern o RT-PCR, tal como se describe en el presente documento, o alternativamente midiendo la cantidad de proteína producida, mediante uno de los métodos tal como se describe en el presente documento. De este modo, el patrón de expresión

génica puede servir como firma molecular, indicativa de la respuesta fisiológica de las células al agente. Por consiguiente, este estado de respuesta puede determinarse antes, y a diversos puntos durante el tratamiento del sujeto con el agente.

5 En una realización preferida, la presente descripción proporciona un método para monitorizar la eficacia de tratamiento de un sujeto con un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro candidato a fármaco identificado por los ensayos de selección descritos en el presente documento) incluyendo las etapas de (i) obtener una muestra antes de la administración de un sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar el nivel de expresión de un gen o combinación de genes, la proteína codificada por los genes, ARNm o ADN genómico en la muestra antes de la administración; (iii) obtener una o más muestras tras la administración del sujeto; (iv) detectar el nivel de expresión o actividad del ADN genómico, ARNm o proteína biomarcadora en las muestras tras la administración; (v) comparar el nivel de expresión o actividad del ADN genómico, ARNm o proteína biomarcadora en la muestra antes de la administración con el gen o combinación de genes, la proteína codificada por los genes, ARNm o ADN genómico en la muestra o muestras tras la administración; y (vi) alterar la administración del agente al sujeto en consecuencia. Por ejemplo, puede ser deseable el aumento de la administración del agente para disminuir la expresión o actividad de los genes hasta niveles inferiores, es decir, para aumentar la eficacia del agente para proteger contra el rechazo del trasplante. Alternativamente, puede ser deseable la disminución de la administración del agente para disminuir la expresión o actividad del biomarcador hasta niveles inferiores a los detectados, es decir, para disminuir la eficacia del agente, por ejemplo, para evitar la toxicidad. Según una realización de este tipo, pueden usarse la actividad o expresión génica como indicador de la eficacia de un agente, incluso en ausencia de una respuesta fenotípica observable.

La presente descripción proporciona métodos tanto profilácticos como terapéuticos para prevenir el rechazo de trasplantes. Con respecto a métodos tanto profilácticos como terapéuticos de tratamiento, tales tratamientos pueden adaptarse o modificarse específicamente, basándose en el conocimiento obtenido del campo de la farmacogenómica. “Farmacogenómica”, tal como se usa en el presente documento, incluye la aplicación de tecnologías genómicas tales como secuenciación génica, genética estadística y análisis de la expresión génica a fármacos en desarrollo clínico y en el mercado. Más específicamente, el término se refiere al estudio de cómo los genes de un sujeto determinan su respuesta al fármaco (por ejemplo, “fenotipo de respuesta al fármaco” o “genotipo de respuesta al fármaco” de un sujeto). Por tanto, otro aspecto de la descripción proporciona métodos para adaptar el tratamiento profiláctico o terapéutico de un sujeto con o bien las moléculas biomarcadoras de la presente descripción o bien moduladores biomarcadores según el genotipo de respuesta al fármaco de ese sujeto. La farmacogenómica permite a un médico o doctor dirigir tratamientos profilácticos o terapéuticos a sujetos que serán los más beneficiados del tratamiento y a evitar el tratamiento de sujetos que experimentarán efectos secundarios relacionados con fármacos tóxicos.

En un aspecto, la descripción proporciona un método para prevenir el rechazo de trasplantes en un sujeto, asociado con el aumento de la expresión o actividad de biomarcador, administrando al sujeto un compuesto o agente que modula la expresión de biomarcador. Los ejemplos de tales compuestos o agentes son por ejemplo compuestos o agentes que tienen propiedades inmunosupresoras, tales como los usados en trasplante (por ejemplo, un inhibidor de calcineurina, ciclosporina A o FK 506); un inhibidor de mTOR (por ejemplo, rapamicina, 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573, biolimús-7 o biolimús-9); una ascomicina que tiene propiedades inmunosupresoras (por ejemplo, ABT-281, ASM981, etc.); corticosteroides; ciclofosfamida; azatiopreno; metotrexato; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico o sal; micofenolato mofetil; 15-desoxiespergualina o un homólogo, análogo o derivado inmunosupresor del mismo; un inhibidor de PKC (por ejemplo, tal como se da a conocer en el documento WO 02/38561 o el documento WO 03/82859, el compuesto del ejemplo 56 ó 70); un inhibidor de la cinasa JAK3 (por ejemplo, N-bencil-3,4-dihidroxibenciliden-cianoacetamida a-ciano-(3,4-dihidroxi)-N-bencilcinnamida (tirfostina AG 490), prodigiosina 25-C (PNU156804), [4-(4'-hidroxifenil)-amino-6,7-dimetoxiquinazolina] (WHI-P131), [4-(3'-bromo-4'-hidroxifenil)-amino-6,7-dimetoxiquinazolina] (WHI-P154), [4-(3',5'-dibromo-4'-hidroxifenil)-amino-6,7-dimetoxiquinazolina] WHI-P97, KRX-211, 3-((3R,4R)-4-metil-3-[metil-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-amino]-piperidin-1-il)-3-oxopropionitrilo, en forma libre o en una forma de sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, mono-citrato (también denominado CP-690,550), o un compuesto tal como se da a conocer en el documento WO 04/052359 o el documento WO 05/066156); un agonista o modulador del receptor S1P (por ejemplo, FTY720 opcionalmente fosforilado o un análogo del mismo, por ejemplo, 2-amino-2-[4-(3-benciloxifenil)-2-clorofenil]etil-1,3-propanodiol opcionalmente fosforilado o ácido 1-[4-[1-(4-ciclohexil-3-trifluorometil-benciloxiimino)-etil]-2-etil-bencil]-azetidín-3-carboxílico o sus sales farmacéuticamente aceptables); anticuerpos monoclonales inmunosupresores (por ejemplo, anticuerpos monoclonales frente a receptores de leucocitos, por ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD40, CD45, CD52, CD58, CD80, CD86 o sus ligandos); otros compuestos inmunomoduladores (por ejemplo, una molécula de unión recombinante que tiene al menos una parte del dominio extracelular de CTLA4 o un mutante del mismo, por ejemplo, al menos una parte extracelular de CTLA4 o un mutante del mismo unida a una secuencia de proteína distinta de CTLA4, por ejemplo, CTLA4lg (por ejemplo designada ATCC 68629) o un mutante del mismo, por ejemplo, LEA29Y); inhibidores de moléculas de adhesión (por ejemplo, antagonistas de LFA-1, antagonistas de ICAM-1 o 3, antagonistas de VCAM-4 o antagonistas de VLA-4). Estos compuestos o agentes pueden usarse también en combinación.

Otro aspecto de la descripción se refiere a métodos de modulación de la expresión o actividad de proteínas biomarcadoras para fines terapéuticos. Por consiguiente, en una realización a modo de ejemplo, el método

modulador de la invención implica poner en contacto una célula con un agente o proteína biomarcadora que modula una o más de las actividades de una actividad de proteína biomarcadora asociada con la célula. Un agente que modula la actividad de proteína biomarcadora puede ser un agente tal como se describe en el presente documento, tal como un ácido nucleico o una proteína, una molécula diana que se produce de manera natural de una proteína biomarcadora (por ejemplo, un sustrato de proteína biomarcadora), un anticuerpo frente a una proteína biomarcadora, un agonista o antagonista de una proteína biomarcadora, un peptidomimético de un agonista o antagonista de una proteína biomarcadora, u otra molécula pequeña. En una realización, el agente estimula una o más actividades de una proteína biomarcadora. Los ejemplos de tales agentes estimuladores incluyen una proteína biomarcadora activa y una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína biomarcadora que se ha introducido en la célula. En otra realización, el agente inhibe una o más actividades de una proteína biomarcadora. Los ejemplos de tales agentes inhibidores incluyen moléculas de ácido nucleico antisentido de una proteína biomarcadora, anticuerpos anti-proteína biomarcadora e inhibidores de una proteína biomarcadora. Estos métodos moduladores pueden realizarse *in vitro* (por ejemplo, cultivando la célula con el agente) o, alternativamente, *in vivo* (por ejemplo, administrando el agente a un sujeto). Como tal, la presente invención proporciona métodos de tratamiento de un sujeto aquejado de una enfermedad o un trastorno caracterizado por actividad o expresión aberrante de una proteína biomarcadora o molécula de ácido nucleico. En una realización, el método implica administrar un agente (por ejemplo, un agente identificado mediante un ensayo de selección identificado en el presente documento), o combinación de agentes que modula (por ejemplo, regula por incremento o regula por disminución) la actividad o expresión de una proteína biomarcadora. En otra realización, el método implica administrar una proteína biomarcadora o molécula de ácido nucleico como terapia para compensar la expresión o actividad de una proteína biomarcadora reducida o aberrante.

La estimulación de la actividad de una proteína biomarcadora es deseable en situaciones en las que la proteína biomarcadora está regulada por disminución de manera anómala y/o en las que un aumento de la actividad de la proteína biomarcadora es probable que tenga un efecto beneficioso. Por ejemplo, la estimulación de la actividad de la proteína biomarcadora es deseable en situaciones en las que un biomarcador está regulado por disminución y/o en las que un aumento de la actividad de la proteína biomarcadora es probable que tenga un efecto beneficioso. Asimismo, la inhibición de la actividad de la proteína biomarcadora es deseable en situaciones en las que la proteína biomarcadora está regulada por incremento de manera anómala y/o en las que una disminución de la actividad de la proteína biomarcadora es probable que tenga un efecto beneficioso.

Las moléculas de ácido nucleico y proteína biomarcadora de la presente descripción, así como agentes, o moduladores que tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre la actividad de la proteína biomarcadora (por ejemplo, expresión génica biomarcadora), tal como se identifica mediante un ensayo de selección descrito en el presente documento, pueden administrarse a sujetos para tratar (profiláctica o terapéuticamente) trastornos asociados al biomarcador (por ejemplo, cáncer de próstata) asociados con actividad de la proteína biomarcadora aberrante. Conjuntamente con tal tratamiento, puede considerarse la farmacogenómica (es decir, el estudio de la relación entre el genotipo de un sujeto y la respuesta de ese sujeto a un fármaco o compuesto foráneo). Las diferencias en el metabolismo de los agentes terapéuticos pueden conducir a toxicidad grave o insuficiencia terapéutica alterando la relación entre la dosis y la concentración en sangre del fármaco farmacológicamente activo. Por tanto, un médico o doctor puede considerar aplicar el conocimiento obtenido en estudios farmacogenómicos relevantes en la determinación de si administrar una molécula biomarcadora o un modulador biomarcador así como adaptar la dosificación y/o el régimen terapéutico de tratamiento con una molécula biomarcadora o modulador biomarcador.

Un enfoque de farmacogenómica para identificar genes que predicen la respuesta farmacológica, conocido como "una asociación del genoma completo", se basa principalmente en un mapa de alta resolución del genoma humano que consiste en biomarcadores relacionados con genes ya conocidos (por ejemplo, un mapa de biomarcadores génicos "bialélicos" que consiste en 60.000-100.000 sitios polimórficos o variables en el genoma humano, cada uno de los cuales tiene dos variantes). Un mapa genético de alta resolución de este tipo puede compararse con un mapa del genoma de cada uno de varios sujetos estadísticamente significativos que toman parte en un ensayo farmacológico de fase II/III para identificar biomarcadores asociados con un efecto secundario o una respuesta farmacológica observada particular. Alternativamente, puede generarse un mapa de alta resolución de este tipo a partir de una combinación de diez millones de polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) conocidos en el genoma humano. Tal como se usa en el presente documento, un "SNP" es una alteración común que se produce en una única base de nucleótido en un tramo de ADN. Por ejemplo, un SNP puede producirse una vez por cada 1000 bases de ADN. Un SNP puede estar implicado en un proceso patológico, sin embargo, la gran mayoría pueden no estar asociados a una enfermedad. Dado un mapa genético basado en la aparición de tales SNP, pueden agruparse sujetos en categorías genéticas dependiendo de un patrón particular de SNP en su genoma objeto. De tal manera, pueden adaptarse regímenes de tratamiento a grupos de sujetos genéticamente similares, teniendo en cuenta rasgos que pueden ser comunes entre tales sujetos genéticamente similares.

Alternativamente, puede utilizarse un método denominado "enfoque de gen candidato" para identificar genes que predicen la respuesta farmacológica. Según este método, si se conoce un gen que codifica para una diana farmacológica (por ejemplo, una proteína biomarcadora de la presente invención), todas las variantes comunes de ese gen pueden identificarse de manera bastante fácil en la población y puede determinarse si tener una versión del gen frente a otra está asociado con una respuesta farmacológica particular.

La invención se basa, en parte, en la observación de que el aumento o la disminución de la expresión de muchos genes diferentes y/o las proteínas codificadas están asociados con ciertos estados de rechazo de injertos. Como resultado de los datos descritos en el presente documento, están disponibles ahora métodos para el diagnóstico rápido y fiable del rechazo crónico y agudo, incluso en casos en los que las biopsias de aloinjertos muestran sólo infiltrados celulares leves. Se describe en el presente documento por primera vez un análisis de genes que están regulados por incremento y/o regulados por disminución simultáneamente y que proporcionan una firma molecular para detectar de manera exacta el rechazo de trasplantes.

Además, la invención se basa parcialmente en la observación de que se expresan genes como agrupaciones génicas-grupos de genes, a menudo funcionalmente relacionados, que tienen perfiles de expresión sustancialmente relacionados en ciertas circunstancias. Por consiguiente, la descripción proporciona además métodos moleculares clásicos y métodos a gran escala para medir la expresión de genes marcadores adecuados.

Los métodos descritos en el presente documento son particularmente útiles para detectar el rechazo crónico de trasplantes. Lo más normalmente, el sujeto (es decir, el receptor de un trasplante) es un mamífero, tal como un ser humano. El órgano trasplantado puede incluir cualquier órgano o tejido trasplantable, por ejemplo riñón, corazón, pulmón, hígado, páncreas, hueso, médula ósea, intestino, nervios, células madre (o células derivadas de células madre), componentes tisulares o materiales compuestos tisulares. En una realización preferida, el trasplante es un trasplante de riñón.

La información generada a partir de más de uno de los enfoques de farmacogenómica anteriores puede usarse para determinar regímenes de tratamiento y dosificación apropiados para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un sujeto. Este conocimiento, cuando se aplica a la dosificación o selección de fármacos, puede evitar reacciones adversas o el fracaso terapéutico y por tanto potenciar la eficacia terapéutica o profiláctica cuando se trata un sujeto con una molécula marcadora o un modulador marcador, tal como un modulador identificado mediante uno de los ensayos de selección a modo de ejemplo descritos en el presente documento.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitativos. El contenido de todas las referencias, patentes y solicitudes de patentes publicadas mencionadas a lo largo de esta solicitud se incorpora al presente documento como referencia.

Ejemplo: Análisis de firmas moleculares (MSA) para rechazo crónico.

A lo largo de los últimos años, se han usado datos de microalineamientos de ADNc u oligonucleótidos de alta densidad para clasificar y predecir el rechazo de aloinjertos y el desenlace del tratamiento (Weintraub y Sarwal, 2006, *Transplant International* 19:775-881). Nuevos métodos de análisis de datos permiten ahora extraer la información biológica a los niveles de ruta, y en correlación estrecha con los parámetros clínicos, redefiniendo por tanto la patología de la enfermedad mediante cambios en el transcriptoma. En este estudio, se aprovechó la genómica para identificar genes expresados de manera diferencial en biopsias de diagnóstico renal a partir de una cohorte de 49 pacientes que presentaban diferentes tipos y grados de RA y RC. Se seleccionaron el algoritmo de análisis de predicción de microalineamientos (PAM) (Tibshirani *et al.*, 2002, *PNAS* 99: 6567-72), y el algoritmo de máquinas de vectores de soporte (SVM) para identificar firmas moleculares Banff 97.

Materiales y métodos

Pacientes

Se incluyeron en el estudio todos los pacientes del Hospital Tenon, París, que se sometieron a biopsia de aloinjerto renal de diagnóstico (desde febrero de 2003 hasta septiembre de 2004) y dieron su consentimiento. Además, se incluyeron algunos pacientes del Hospital Bicêtre, París, y el Hospital Pellegrin, Burdeos. En total, se recogieron 75 biopsias con agujas gruesas renales de diagnóstico en RNAlater (Ambion, Austin, TX). Se muestreó y procesó por separado parte de cada biopsia para la tinción y el análisis histológicos. Se tomaron otras 19 muestras control a partir de muestras de nefrectomía de pacientes que padecían cáncer renal sólido usando la corteza suprarrenal no afectada a una distancia máxima de los tumores malignos circunscritos.

Se recogieron la descripción clínica de los pacientes y la evaluación histopatológica de las biopsias (clasificación Banff 97). Para CAN, se determinaron diferentes puntuaciones de gravedad de la enfermedad para cg, glomerulopatía, ci, fibrosis intersticial, ct, atrofia tubular, cv, atrofia vascular/engrosamiento de la íntima, y ah, engrosamiento hialino arterial. La tabla 3 presenta los parámetros clínicos más importantes y la clasificación Banff 97 global para todos los pacientes finalmente incluidos en este análisis tras un control de calidad riguroso del ARN extraído y las hibridaciones de microalineamientos.

Tabla 3: Características clínicas y demográficas de los cinco grupos de biopsias de París para indicaciones clínicas según el análisis histológico

Parámetro	CAN	CAN + RA	RA	Límite	SR
Número de biopsias	22	7	8	3	7
Número de pacientes*	22	6	8	2	7
Edad del receptor [años]	46,9 ± 12,2 [#]	41,7 ± 7,6	44,9 ± 10,9	34,6 ± 10,2	39,4 ± 8,7 [#]
Género del receptor [n, % de hombres]	15 (68,2%)	2 (33%)	6 (75%)	1 (50%)	6 (86%)
Edad del donante [años]	43,4 ± 17,1 [#]	39,0 ± 19,8	36,3 ± 8,3 [#]	46,5 ± 0,7	45,2 ± 15,4
N.º de apareamientos erróneos de HLA	2,9 ± 1,3 [#]	2,7 ± 2,1 [#]	2,8 ± 1,6 [#]	3,5 ± 0,7	1,8 ± 1,5 [#]
N.º de episodios de RA históricos [% de pacientes con ≥ 1]	36,4	83,3	75	100	14,3
Tiempo de la biopsia [meses tras el tx]	83,2 ± 64,8	52,1 ± 48,3	28,1 ± 51,1	3,4 ± 4,9	25,1 ± 51,4
Número de pacientes con toxicidad de CNI (histología)	3	0	1	0	1
Número de pacientes en un régimen libre de CNI	2	0	1	0	0
Creatinina sérica [μMol]	268,8 ± 208,5	461,1 ± 317,3	253,0 ± 109,3	223,0 ± 40,7 [#]	160,0 ± 44,4

Abreviaturas: CAN = nefropatía de aloinjerto crónica; RA = rechazo agudo, SR = sin rechazo (pero no estable).

*5 pacientes tuvieron dos biopsias secuenciales

Algunos valores desconocidos

Todos los pacientes seguían un régimen triple de CNI convencional: a base de un 68% de ciclosporina y un 32% de tacrolímús, principalmente combinado con micofenolato y corticosteroides.

Origen étnico: 60% de raza blanca, 18% africano, 22% de otro origen.

Se incluyen todas las muestras usadas para la generación de firmas (véase la tabla de material complementario S1 para datos individuales)

Preparación de ARN

- 5 Se extrajo el ARN total mediante RNeasy según el protocolo del fabricante (Qiagen, Hilden, Alemania). Se cuantificó el ARN mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) y se controló la calidad mediante un bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Sólo las biopsias que daban resultado ARN total de alta calidad se analizaron adicionalmente. Se sometieron 50 ng de ARN total a amplificación de ADnc de 2 ciclos Affymetrix, marcaje fluorescente e hibridación con el alineamiento Human Genome U133 Plus
- 10 2.0 que contiene ~54.625 conjuntos de sondas para >47.000 transcritos humanos diferentes (Affymetrix, Santa Clara, CA).

Análisis de microalineamientos

Se dedujo un nivel de expresión medio ponderado único para cada gen junto con un valor de p que indica la detección fiable del transcrito usando el software Microarray Suite 5.0 (MAS5, Affymetrix). Se aumentaron a escala los datos a partir de cada alineamiento (intensidad diana de 150). Para análisis adicionales, se sometieron los archivos de intensidad celular (CEL) a normalización mediante análisis multichip robusto (*Robust Multichip Analysis* (RMA). Se evaluaron varias medidas de control de calidad en cada alineamiento, incluyendo la revisión de las imágenes escaneadas para detectar artefactos significativos, mediciones de fondo y ruido significativas que difieren significativamente de otros chips, el promedio de llamadas presentes o ausentes. Además, se excluyeron del estudio los alineamientos que no pasaban dos de las siguientes tres medidas de control de calidad del estudio: la razón 3' a 5' de las intensidades para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (razón <4 considerada adecuada), el promedio de llamadas (>40% de llamadas presentes era aceptable), el factor de aumento a escala (>2 o <0,5) se excluyeron del análisis.

Se excluyeron 4 muestras (3 nefrectomizadas y 1 RA) basándose en los filtros de control de calidad descritos anteriormente. Además, se consideraron 3 muestras nefrectomizadas como resultados atípicos biológicos basándose en su perfil de expresión génica global. En total, se obtuvieron 63 conjuntos de datos que cumplían los criterios de control de calidad (tabla 1).

Se realizó el análisis de los datos sin procesar de Genechip® usando el software GeneSpring GX7.3 (Agilent Technologies). Se identificaron genes expresados de manera diferencial entre diferentes clases de muestras (por ejemplo, control frente a RA) usando ANOVA de una vía ($p < 0,05$), con o sin una tasa de descubrimiento falsa $\leq 5\%$ (FDR, Benjamini y Hochberg) y un punto de corte adicional basado en la expresión de cambio de 2 veces.

En ausencia de un consenso amplio referente a un algoritmo de predicción de clases, se decidió mostrar los resultados procedentes del análisis de predicción de microalineamientos (PAM) (Wieczorek *et al.*, 2006, American Journal of Transplantation 6:1285-96), que muestra resultados robustos y constantes en manos de los inventores (PAM versión 1.28 disponible de BioConductor o www-stat.stanford.edu/~tibs/PAM/Rdist/). Se realizó una validación cruzada de 10 veces y se notificó la tasa de clasificación errónea global. Se eligieron diferentes puntos de corte del nivel de significación para encontrar la tasa de clasificación errónea de validación cruzada más baja con el mínimo número de genes. También se usó el algoritmo de máquinas de vectores de soporte (SVM) (GeneSpring GX 7.3) para la predicción de clases y muestra resultados muy similares en comparación con PAM en la mayoría de los casos.

Análisis de firmas moleculares para rechazo crónico

El objetivo inicial era definir una firma molecular/clasificador que pudiese diferenciar entre los diferentes grados de CR y muestras control. Para generar la firma molecular, se analizó un total de 35 biopsias, 13 biopsias de los pacientes nefrectomizados control, 4 muestras de CAN grado I, 10 de CAN grado II y 8 CAN grado III. El algoritmo PAM identificó un conjunto de 33 que podían diferenciar los diferentes grupos con la tasa de error de validación cruzada mínima de 0,12, es decir, los diferentes grados de RC se clasifican con una exactitud del 88%. Usando 2 métodos de agrupamiento no supervisados, basándose en el perfil de expresión de estos 33 genes, se pudo separar los pacientes en grupos correspondientes a los grados histológicos. Entre este conjunto de genes, 15 se regulan por incremento gradualmente desde el grado I hasta el III mientras que los 18 genes restantes se regulan por disminución (tabla 1). Mientras que el grado I y II se separan claramente entre sí, las muestras de grado II presentan un estadio heterogéneo intermedio, que podría corresponder a un estado patológico activo evolucionado.

Con el fin de evaluar el rendimiento del clasificador molecular, se sometió a prueba en dos conjuntos de muestras independientes. En primer lugar, se tuvo la oportunidad de analizar los datos de expresión génica de un modelo de primate no humano (PNH) interno de rechazo crónico. De manera interesante, un análisis de PCA con los 33 genes definidos en CAN humana diferenció claramente el rechazo crónico de los riñones trasplantados en monos normales. El análisis mediante PAM predijo con el 100% de exactitud el grupo 2 de biopsias. En una segunda etapa, se sometieron a prueba 3 nuevas muestras de CAN de grado I, procedentes de un segundo muestreo, y 7 muestras de CAN que no se incluyeron en el análisis inicial (3 muestras de grado II y 4 de grado III que también presentan niveles de rechazo agudo (muestras de RA+RC)). Se usaron estas 10 nuevas muestras como conjunto de validación, mientras que se usó el conjunto inicial de 35 biopsias como conjunto de entrenamiento. Un algoritmo SVM de predicción de clases con las 33 firmas génicas pudo predecir correctamente todas las nuevas muestras excepto un grado II, que se clasificó como grado I, presentando una exactitud global del 89%. Estos 2 resultados independientes demuestran la relevancia y robustez de la firma molecular identificada para CAN, independientemente de bajo número de biopsias incluidas en este estudio.

Este estudio demuestra la posibilidad de usar el análisis de firma molecular para diferenciar clases de rechazo de aloinjerto. Por primera vez, este trabajo mostró que una firma molecular podría diferenciar biopsias según la gravedad gradual de CAN (I, II, III). La lista de 33 conjuntos de sondas/genes identificados en este análisis clasificó correctamente diferentes grados de CAN con una exactitud del 90% en seres humanos y una exactitud del 100% en un estudio con NHP de CAV. Es difícil lograr una tasa de clasificación errónea inferior debido a la ambigüedad inherente del diagnóstico histopatológico visual. Las diferencias entre CAN de grado I y II son ligeras y propensas a ponderación subjetiva por patólogos individuales. Esta tendencia está bien reflejada por la expresión génica. Por ejemplo, mientras que las muestras de grado III se separan fácilmente, varias muestras podían clasificarse como o

5 bien de grado I o bien de II. En este sentido, las muestras de grado I y grado II se clasifican a menudo de manera diferencial mediante los algoritmos PAM y SVM (datos no mostrados). La expresión génica global sugiere que muestras de biopsia de grado II experimentan un estadio de CAN muy activo y progresivo que hace que este grupo de pacientes sea heterogéneo. De hecho, es sorprendente observar que las muestras de grado II presentan un enriquecimiento significativo de genes asociados con la función inmunitaria e inflamación a un nivel similar a RA, aunque mucho mayor que muestras de grado I o III. Sin embargo, CAN III puede representar un estadio tardío de esclerosis tisular con una actividad transcripcional decreciente con respecto a estos dos estados. El diagnóstico diferencial temprano será importante para la intervención para reducir CAN antes de que se manifieste el grado III supuestamente irreversible, teniendo en cuenta que el 25% de los pacientes demuestran CAN de grado II un año tras el trasplante).

10 El análisis de la ruta de CAN reveló que procesos biológicos en CAN temprana se comportan de manera diferente de los grados más tardíos con un aumento ligero pero significativo en genes de rutas de metabolismo y energía que disminuyen con la progresión de la enfermedad. Este fenómeno podría explicarse por la hipertrofia renal compensadora bien conocida en nefropatía diabética. En este caso, la lesión del riñón se compensa pronto por la hipertrofia y proliferación de células parenquimales y mesangiales que conducen a un aumento de la función tubular. Durante los estadios tempranos de CAN, es tentador plantear la hipótesis de que este mecanismo compensador se produce y se refleja al nivel transcripcional. En comparación con RA y CAN de grado II, la gran mayoría de los genes identificados cambió significativamente en CAN III humana avanzada. En este caso, están asociados con rutas de señalización de TGF y Wnt, indicativas de progresión de fibrosis intersticial y desarrollo/activación de miofibroblastos en estado inflamatorio crónico.

15 Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar usando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. Tales equivalentes pretenden abarcarse por las siguientes reivindicaciones.

20 Las diversas características y realizaciones de la presente invención, a las que se hacen referencia en secciones individuales anteriormente se aplican, según sea apropiado, a otras secciones, cambiando lo que se deba cambiar. En consecuencia, las características especificadas en una sección pueden combinarse con características especificadas en otras secciones, según sea apropiado.

25 Todos los métodos dados a conocer y reivindicados en esta memoria descriptiva pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación laboriosa en vista de la presente descripción. Mientras que los métodos de esta invención se han descrito en cuanto a realizaciones preferidas, resultará evidente para los expertos en la técnica que pueden aplicarse variaciones a los métodos y en las etapas o en las secuencias de etapas del método descrito en el presente documento sin apartarse del alcance de la invención.

Tabla 4 – Análisis de la expresión

<i>Id de Affy</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>control</i>	<i>FC I frente a control</i>	<i>FC II frente a control</i>	<i>FC III frente a control</i>
203645_s_at	324,46	1198,72	2270,94	261,13	1,24	4,59	8,70
215049_x_at	417,4	1634,22	3044,82	360,08	1,16	4,54	8,46
229554_at	150,30	416,06	643,58	99,32	1,51	4,19	6,48
235964_x_at	555,11	1307,39	1977,18	319,81	1,74	4,09	6,18
202800_at	153,24	333,99	712,59	160,57	0,95	2,08	4,44
213817_at	35,47	81,51	178,22	40,71	0,87	2	4,38
204438_at	602,89	1269,26	2011,43	469,11	1,29	2,71	4,29
201761_at	227,91	446,65	821,61	200,31	1,14	2,23	4,10
226142_at	43,90	116,01	170,77	42,4	1,04	2,74	4,03
225662_at	398,36	643,62	1351,06	409,82	-1,03	1,57	3,30
217762_s_at	282,89	553,52	859,79	265,55	1,07	2,08	3,24
213519_s_at	191,45	346,06	536,19	178,84	1,07	1,93	3,00
230179_at	117,70	199,64	347,95	116,33	1,01	1,72	2,99
203222_s_at	45,28	79,35	106,35	46,83	-1,03	1,69	2,27

ES 2 379 673 T3

219090_at	119,98	172,57	233,84	115,76	1,04	1,49	2,02
224357_s_at	352,36	444,14	545,73	387,84	-1,10	1,15	1,41
219260_s_at	395,30	170,32	240,65	232,58	1,70	-1,37	1,03
239161_at	676,92	411,71	362,41	427,19	1,58	-1,04	-1,18
236442_at	250,21	137,61	134,10	174,29	1,44	-1,27	-1,30
234219_at	614,77	355,49	173,82	226,71	2,71	1,57	-1,30
242274_x_at	59,62	34,61	25,25	35,70	1,67	-1,03	-1,41
231994_at	854,58	619,25	444,97	644,19	1,33	-1,04	-1,45
89977_at	674,84	421,99	280,13	434,88	1,55	-1,03	-1,55
230716_at	339,70	175,67	112,57	210,21	1,62	-1,20	-1,87
232271_at	780,42	402,48	245,12	469,04	1,66	-1,17	-1,91
239983_at	338,56	123,38	97,93	191,63	1,77	-1,55	-1,96
201041_s_at	3670,49	1935,86	5397,73	11170,3	-3,04	-5,77	-2,07
207095_at	805,75	285,76	230,38	506,75	1,59	-1,77	-2,20
242998_at	708,77	256,05	174,83	402,16	1,76	-1,57	-2,30
219840_s_at	341,20	155,14	80,98	195,63	1,74	-1,26	-2,42
239929_at	483,71	104,66	74,9	225,73	2,14	-2,16	-3,01
223582_at	715,99	221,92	126,52	480,31	1,49	-2,16	-3,80
205278_at	220,05	60,19	80,03	359,59	-1,63	-5,97	-4,49

REIVINDICACIONES

1. Método de clasificación del estadio de nefropatía de aloinjerto crónica/esclerosante en un sujeto que padece rechazo crónico de un riñón trasplantado, que comprende las etapas de:
 - 5 (a) determinar el nivel de expresión en una muestra tras el trasplante de un sujeto de los genes identificados en la tabla 1;
 - (c) comparar el nivel de expresión génica de dichos genes en la muestra tras el trasplante con la magnitud de expresión génica de los mismos genes en una muestra control para generar un perfil de expresión diferencial; y
 - 10 (d) comparar el perfil de expresión diferencial con uno o más perfiles de expresión diferencial de referencia indicativos de uno más estadios de nefropatía de aloinjerto crónica/esclerosante, clasificando de ese modo el estadio de nefropatía de aloinjerto crónica/esclerosante en el sujeto.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dichos genes seleccionados tienen un perfil de expresión que distingue CAN en estadio III de estadios anteriores.