

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 929**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03792410 .7**
- 96 Fecha de presentación: **21.08.2003**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1532278**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.05.2005**

54 Título: **Diagnóstico de rechazo crónico**

30 Prioridad:  
**22.08.2002 US 405225 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.05.2012**

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

72 Inventor/es:  
**KRAUSE, Andreas;  
NIESE, Detlef;  
RAULF, Friedrich y  
SCHERER, Andreas**

74 Agente/Representante:  
**Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 380 929 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

### Diagnóstico de rechazo crónico

5 Esta invención se relaciona con un método para hacer seguimiento del estado de un tejido u órgano trasplantado en un beneficiario. En particular, la invención se relaciona con el uso de análisis de expresión génica para determinar la predicción temprana de rechazo crónico de un aloinjerto.

10 El rechazo crónico (CR por sus siglas en inglés) de un aloinjerto es la principal causa para el fracaso de la supervivencia del injerto a largo plazo. En contraste con los episodios tratables de rechazo agudo, el rechazo crónico no puede ser revertido hasta la fecha por ningún tipo de tratamiento cuando es detectado histológicamente, no se ha probado que pueda ser prevenido por medio de algún régimen inmunosupresor y su patogénesis no está completamente entendida pero involucra factores tanto inmunológicos como no inmunológicos. La característica para el rechazo crónico en todos los injertos de órganos sólidos es un engrosamiento concéntrico de la íntima arterial por remodelación vascular. Los aloinjertos de riñón con rechazo crónico exhiben además una fibrosis parenquimal pronunciada y esclerosis glomerular: clínicamente, el Cr se manifiesta por medio de una declinación progresiva en la función renal, acompañada de proteinuria e hipertensión.

15 Los intentos para identificar biomarcadores en investigación de trasplantes ha sido impulsada principalmente por hipótesis y conduce a la caracterización de genes individuales, polimorfismos, características bioquímicas o histopatológicas. Sin embargo, la mayor parte de estos estudios fueron llevados a cabo sobre muestras de tejido que ya mostraban signos evidentes de enfermedad y por lo tanto únicamente revelaron una asociación con la futura severidad de la enfermedad.

20 Existe la necesidad de contar con una herramienta confiable para pronóstico temprano y hacer seguimiento de un CR, particularmente el pronóstico temprano de CR antes de cualquier manifestación clínica o histológica, por ejemplo dentro del primer año después de realizado el trasplante; tal ayuda sería invaluable por ejemplo para la optimización de los regímenes actuales de tratamiento y el diseño de ensayos clínicos, que incluyan nuevos agentes que inhiban el CR.

25 La presente invención se relaciona con la identificación de genes que se expresen en forma diferencial en biopsias de trasplantes, por ejemplo biopsias renales, antes del inicio del CR en pacientes que desarrollarán CR después de tomada la biopsia, y en pacientes que no lo harán. El patrón de expresión génica resultante de un subgrupo de los genes permite una predicción estadísticamente muy significativa de la incidencia del CR. Por ejemplo, los genes identificados en biopsias renales después del trasplante antes de que el CR se haga histológicamente manifiesto, se presentan en las Tablas 1 (genes con mayor actividad) y 2 (genes con menor actividad) y un subgrupo de genes preferidos en la Tabla 3. Las secuencias completas de estos 65 genes divulgados en esta solicitud se encuentran disponibles utilizando el número de acceso el GenBank mostrado en las Tablas 1 a 3.

30 Los genes identificados de acuerdo con la invención son biomarcadores útiles de predicción para el pronóstico del CR en individuos trasplantados. Cualquier selección, de al menos uno de estos genes, puede ser utilizada como biomarcador sustituto para pronóstico temprano del CR. En realizaciones particularmente útiles, una pluralidad de estos genes, por ejemplo se pueden seleccionar los 10 genes de la Tabla 3 en el caso de biopsias renales, y se puede hacer seguimiento simultáneamente a su expresión del ARNm para proporcionar los perfiles de expresión para uso en diferentes aspectos.

La invención proporciona métodos y usos como se define en las reivindicaciones.

40 Por lo tanto, la invención proporciona el uso del gen KRT15 y de genes como los enlistados en la Tabla 3, como un biomarcador temprano para el rechazo crónico de un trasplante, por ejemplo como un biomarcador para el CR antes de cualquier manifestación clínica o histológica evidente, por ejemplo dentro del primer año después de realizado el trasplante.

45 Los métodos de la presente invención deben ser realizados *in vitro*, por ejemplo, los niveles de biomarcadores deben ser analizados en tejidos o en fluidos extraídos u obtenidos de un individuo trasplantado.

Los métodos para detectar el nivel de expresión del ARNm son bien conocidos en el arte e incluyen, pero no se limitan a, PCR con transcripción inversa, PCR cuantitativa en tiempo real, transferencias tipo Northern y otros métodos de hibridación.

50 Un método particularmente útil para detectar el nivel de transcritos de ARNm obtenidos a partir de una pluralidad de los genes divulgados involucra la hibridación de ARNm marcado hasta un arreglo ordenado de oligonucleótidos. Tal método permite determinar simultáneamente el nivel de transcripción de una pluralidad de estos genes para generar perfiles o patrones de expresión génica. El perfil de expresión génica derivado de la biopsia obtenida del individuo

trasplantado en riesgo de desarrollar CR puede ser comparado con el perfil de expresión génica derivado de la muestra obtenida de un individuo trasplantado que no desarrollará CR.

5 En una modalidad adicional, la medición de los perfiles de expresión de uno o de una pluralidad de estos genes o proteínas codificadas podría proporcionar herramientas moleculares valiosas para examinar la eficacia de los medicamentos para inhibir, por ejemplo para prevenir o tratar, el CR. Los cambios en el perfil de expresión de un perfil de línea base mientras el paciente trasplantado es sometido a terapia. Por lo tanto, esta invención también proporciona un método para seleccionar un individuo trasplantado para determinar la probabilidad de que el individuo responda a la terapia para el CR, métodos para la identificación de agentes que sean útiles en el tratamiento de un individuo trasplantado que tenga signos de CR y métodos para hacer seguimiento a la eficacia de ciertos tratamientos con fármacos para el CR.

10 En un aspecto, la invención presenta un método *in vitro* para identificar al menos un gen que sea expresado en forma diferencial en un aloinjerto de un tipo de tejido dado antes del inicio del CR en un individuo trasplantado de prueba comparado con

15 i) un perfil de línea base de expresión génica que se origina a partir del mismo tipo de tejido de un individuo trasplantado de control que se sabe que no desarrolla CR; o

ii) un perfil de línea base de expresión génica que se origina a partir del individuo trasplantado de prueba en la fecha el trasplante.

20 El término “expresado diferencialmente” se refiere a un nivel de expresión dado del gen del aloinjerto y se define como una cantidad que es sustancialmente superior o menor a la cantidad del nivel de expresión correspondiente de línea base.

Por lo tanto, el método para diagnosticar rechazo crónico (CR) en un individuo trasplantado *in vitro* comprende:

25 a) detectar como el valor de línea base el nivel de expresión de ARNm correspondiente al gen KRT15, originándose dicho gen de una biopsia de tejido de aloinjerto específico de un individuo de control trasplantado del cual se sabe que no desarrolla CR;

30 b) detectar un nivel de expresión de ARNm correspondiente al gen identificado en a) en una biopsia de tejido de aloinjerto renal obtenida de un individuo de prueba que recibió un trasplante de riñón en el lapso de 4 a 7 meses después recibido el trasplante; y

35 c) comparar el valor de línea base con el nivel de expresión de ARNm detectada en la etapa b) en donde el valor de la línea base menor al valor del ensayo en el caso de los genes KRT15 predice que el individuo que recibió el trasplante de riñón tiene un mayor riesgo de desarrollar CR.

Además, la invención provee un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:

40 a) detectar como el valor de línea base el nivel de expresión de ARNm correspondiente al gen hoxB7, NPRL2, OS9,  $\gamma$ 7 para proteína G, OBMCL, DFKZp558B1722, EST ID 32f4, hoxA7 y PRLR, originándose dichos genes a partir de una biopsia de tejido de aloinjerto de un individuo de control trasplantado que se sabe que no desarrolla CR;

45 b) detectar un nivel de expresión de ARNm correspondiente a los genes identificados en a) en una biopsia de tejido de aloinjerto de riñón obtenida de un individuo de prueba que recibió un trasplante de riñón en el lapso de 4 a 7 meses después de recibido el implante; y

50 c) comparar el valor de línea base con el nivel de expresión de ARNm detectado en la etapa b) en donde el valor de línea base menor al valor del ensayo en el caso de los genes hoxB7, NPRL2, OS9,  $\gamma$ 7 para proteína G, OBMCL, DFKZp558B1722 y EST ID 32f4 y mayor que el valor del ensayo, predice que el individuo que recibió el trasplante de riñón tiene un mayor riesgo de desarrollar CR.

En las etapas b) anteriores, el nivel de ARNm o de proteína codificada es preferiblemente detectada en el lapso de 4 a 7 meses después e recibido el implante, más preferiblemente alrededor de los 6 meses después haber recibido el implante.

45 Por antes del inicio del CR o del diagnóstico temprano de CR se entiende antes de detectar cualquier manifestación clínica o histológica evidente de CR en el individuo trasplantado.

El método de diagnóstico de CR de acuerdo con la invención puede ser aplicado también a pacientes de mantenimiento, es decir a pacientes que han sido trasplantados hace más de un año. Por lo tanto, se realizan biopsias y se compara el nivel de expresión de ARNm correspondiente al menos a un gen con el nivel en los valores de control de referencia para identificar pacientes que desarrollarán CR durante el siguiente par de meses.

- 5 En otro aspecto, la invención provee un método para hacer seguimiento, por ejemplo prevenir o inhibir o reducir o tratar CR en un individuo trasplantado en riesgo de desarrollar CR con un inhibidor de CR (por ejemplo una molécula pequeña, un anticuerpo u otro agente terapéutico o agente candidato). Hacer seguimiento a la influencia de agentes (por ejemplo medicamentos) sobre el nivel de expresión de un marcador de la invención que pueden ser aplicados no solamente en la selección de medicamentos básicos, sino también en ensayos clínicos. Por ejemplo, se puede
- 10 hacer seguimiento a la efectividad de un agente para afectar la expresión del marcador en ensayos clínicos de individuos trasplantados que reciben tratamiento para la inhibición del CR.

Tal método comprende:

- a) obtener una muestra de un individuo que recibió un trasplante de riñón antes de la administración de un agente que inhiba el CR,
- 15 b) detectar el nivel de expresión de ARNm correspondiente al gen KRT15 en la muestra obtenida en la etapa a) en una biopsia de tejido de un aloinjerto renal de dicho individuo que recibió trasplante de riñón,
- c) obtener al menos una muestra del paciente que recibió el trasplante de riñón después de la administración de un agente que inhibe el CR,
- d) detectar el nivel de expresión de ARNm correspondiente al gen KRT15 en la muestra obtenida en la etapa c) en
- 20 una biopsia de tejido de aloinjerto renal de dicho individuo que recibió el trasplante de riñón,
- e) comparar el nivel de expresión de ARNm o de proteína detectada en la etapa b) en donde el valor de línea base menor al valor del ensayo en el caso de los genes KRT15 predice que el individuo que recibió el trasplante de riñón tiene un mayor riesgo de desarrollar CR.

La invención también proporciona un método de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además:

- 25 a) detectar como el valor de línea base el nivel de expresión de ARNm correspondiente al gen hoxB7, NPRL2, OS9,  $\gamma$ 7 para proteína G, OBMCL, DFKZp558B1722, EST ID 32f4, hoxA7 y PRLR, originándose dichos genes a partir de una biopsia de tejido de aloinjerto de un individuo de control trasplantado que se sabe que no desarrolla CR;
- b) detectar un nivel de expresión de ARNm correspondiente a los genes identificados en a) en una biopsia de tejido
- 30 de aloinjerto renal obtenida de un individuo de prueba que recibió un trasplante de riñón en el lapso de 4 a 7 meses después de recibido el trasplante; y
- c) comparar el valor de línea base con el nivel de expresión de ARNm detectado en la etapa b) en donde el valor de línea base menor al valor del ensayo en el caso de los genes hoxB7, NPRL2, OS9,  $\gamma$ 7 para proteína G, OBMCL, DFKZp558B1722 y EST ID 32f4 y mayor que el valor del ensayo, predice que el individuo que recibió el trasplante de riñón tiene un mayor riesgo de desarrollar CR.
- 35 Por lo tanto, la incorporación de datos del perfil de expresión génica de biopsias humanas, por ejemplo biopsias de protocolo renal humano, ayudarán a mejorar el proceso de selección de pacientes durante ensayos clínicos dirigidos tanto al tratamiento como a la prevención del progreso hacia el CR.

- 40 Por individuo trasplantado se entiende un individuo que recibe un tejido o un órgano de un donante, preferiblemente de la misma especie, por ejemplo riñón, corazón, pulmón, corazón y pulmón combinados, hígado, páncreas, intestino (por ejemplo colon, intestino delgado, duodeno), tejido neuronal, miembros.

Preferiblemente más de un gen, por ejemplo un grupo de genes, se utilizan en los métodos de la invención. Los métodos de la invención son particularmente preferidos en trasplante de riñón.

- 45 Como ya se mencionó, se puede utilizar cualquier selección, de al menos uno, de los genes indicados en la Tabla 3. Los genes preferidos de la Tabla 3 son por ejemplo OS-9, NPRL2, HOXB7, G-CSF y/o BFGF. La mayoría de los genes descritos aquí no han sido implicados en el rechazo de un aloinjerto renal y están asociados con diferentes funciones. Por ejemplo, OS9, también llamado APRIL (proteína ácida rica en leucinas), es un miembro de la familia de la fosfoproteína nuclear ácida 32, con homología de secuencia con PHAPI, una proteína asociada con HLA putativa de la clase II. OS9 también comparte similitud de secuencia con las proteínas DEK y SET de proto-

oncogenes, relacionadas con leucemia mieloide. OBCML (tipo proteína de enlazamiento de opiáceos/molécula de adhesión celular) ha sido descrita únicamente para ser expresada en ciertas regiones del cerebelo, nunca en el riñón. El gen NPRL2 supresor tumoral, que muestra una similitud de secuencia con el gen regulador de la nitrógeno permeasa de levadura, ha mostrado que está localizado en la región cromosómica humana 3p21.3, como uno de los  
5 25 genes supresores tumorales dentro de esta región que están involucrados en el desarrollo de cáncer de pulmón y de mama.

Se pueden generar perfiles de expresión génica utilizando por ejemplo la tecnología de microarreglos Affymetrix. Los microarreglos son conocidos en el arte y consisten de una superficie con la cual las sondas que corresponden en secuencia con los productos génicos (por ejemplo, los ARNm, polipéptidos, fragmentos de los mismos, etc.) pueden estar específicamente hibridados o enlazados a una posición conocida. Los datos de intensidad de la hibridación detectados por el escáner son adquiridos automáticamente y procesados por el software GENECHIP<sup>®</sup>. Los datos en  
10 bruto se normalizan para niveles de expresión utilizando una intensidad objetivo de 200.

El estado transcripcional de una célula puede ser medido por medio de otras tecnologías de expresión génica conocidas en el arte. Varias de tales tecnologías producen fondos comunes de fragmentos de restricción de complejidad limitada para análisis electroforético, tal como métodos que combinan digestión con una enzima de restricción doble con iniciadores de eliminación gradual (por ejemplo, EP-A1-0 534858), o métodos de selección de fragmentos de restricción con sitios más cercanos a un extremo definido del ARNm (por ejemplo, Prashar et al, Proc. Nat. Acad. Sci., 93, 659 - 663, 1996). Otros métodos muestrean estadísticamente fondos comunes de ADNc, tal como por medio de secuenciación de bases suficientes (por ejemplo, 20 - 50 bases) en cada uno de los múltiples  
15 ADNc para identificar cada ADNc, o por medio de secuenciación de etiquetas cortas (por ejemplo, 9 - 10 bases) que se generan en posiciones conocidas con relación a un patrón de la ruta del extremo definido del ARNm (por ejemplo, Velculescu, Science, 270, 484 - 487, 1995).

En una modalidad preferida, se implementan las etapas de cómputo de los métodos anteriores sobre un sistema de cómputo o sobre uno o más sistemas de cómputo en red con el propósito de proporcionar un equipo conveniente y poderoso para formar y analizar modelos de sistemas biológicos. El sistema de cómputo puede ser una plataforma única de hardware que incluye componentes internos y que está enlazado a componentes externos. Los componentes internos de este sistema de cómputo incluyen un elemento procesador interconectado con una memoria principal. Los componentes externos incluyen un almacenamiento masivo de datos. Este almacenamiento masivo puede estar compuesto por uno o más discos duros. Otros componentes externos incluyen un dispositivo de interfaz de usuario, que puede ser un monitor y teclados, junto con un dispositivo señalador u otros dispositivos gráficos de entrada. Típicamente, el sistema de cómputo está enlazado también a otros sistemas de cómputo locales, sistemas de cómputo remotos o redes de comunicación para áreas extensas, por ejemplo Internet. Este enlace de red le permite al sistema de cómputo compartir datos y procesamiento de tareas con otros sistemas de  
25 cómputo.

Cargado en la memoria durante la operación de este sistema se encuentran diferentes componentes de software que son tanto estándar en el arte como especiales para la presente invención. Estos componentes de software permiten que el sistema de cómputo en conjunto funcione de acuerdo con los métodos de esta invención. Estos componentes del software están típicamente almacenados sobre medio de almacenamiento masivo o sobre medios removibles, por ejemplo discos flexibles o CD-ROM. El componente del software representa al sistema operativo, que es responsable de manejar el sistema de cómputo y sus interconexiones de red. Preferiblemente los métodos de esta invención se programan en paquetes de software matemáticos, que permiten la entrada simbólica de ecuaciones y de especificaciones de procesamiento de alto nivel, incluidos los algoritmos que se utilizan, y que por lo tanto liberan a un usuario de la necesidad de programar en forma procesal ecuaciones o algoritmos individuales.  
35

En modalidades preferidas, los componentes del software analítico incluyen componentes separados del software que interactúan entre sí. El software analítico representa una base de datos que contiene todos los datos necesarios para la operación del sistema. Tales datos generalmente incluirán, pero no se limitan a, los resultados de experimentos anteriores, datos del genoma, procedimientos experimentales y costos, y otra información, que será evidente para aquellas personas capacitadas en el arte. El software analítico incluye un componente de cómputo y de reducción de datos que comprende uno o más programas que ejecutan los métodos analíticos de la invención. El software analítico también incluye una interfaz de usuario que le proporciona al usuario del sistema de cómputo el control y la entrada de modelos de red de prueba y, opcionalmente, datos experimentales. La interfaz de usuario puede incluir una interfaz de arrastre y liberación para especificar hipótesis al sistema. La interfaz de usuario puede incluir también medios para cargar datos experimentales a partir del componente de almacenamiento masivo, a partir del medio removible o a partir de un sistema de cómputo diferente que se comunica con el presente sistema sobre una red.  
45  
50  
55

La invención también proporciona un proceso para preparar una base de datos que comprende al menos uno de los marcadores expuestos en esta invención, por ejemplo, los ARNm. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos se almacenan en un medio de almacenamiento digital tal como un sistema de procesamiento de datos para representación estandarizada de los genes que identifican un pronóstico temprano de CR. El sistema de

procesamiento de datos es útil para analizar la expresión génica entre dos muestras de tejido tomadas en diferente momento, por ejemplo, el día del trasplante y después del trasplante. Los polinucleótidos aislados se secuencian. Se pueden comparar las secuencias de las muestras con la(s) secuencia(s) presente(s) en la base de datos utilizando técnicas de búsqueda de homología. Los sistemas de cómputo alternativos y métodos para implementar los métodos analíticos de esta invención serán evidentes para alguien capacitado en el arte y se pretende que estén incluidos dentro de las reivindicaciones acompañantes.

#### Identificación de marcadores para pronosticar el CR

Como parte de un estudio de un grupo paralelo, de doble simulación, doblemente ciego, multicéntrico, aleatorio, se toman biopsias de protocolo renal en serie al momento de realizar el trasplante (línea base), luego de 6 meses y luego de 12 meses después de realizado el trasplante.

Después de la extracción del ARN de estas biopsias, el rendimiento completo de los rangos de ARN total de únicamente alrededor de 10 ng hasta alrededor de 1,5 µg. La mayoría de las muestras contienen menos de 30 ng de ARN total, que está muy por debajo de la cantidad mínima de 1 a 5 µg de los kits de marcación de ARN que se encuentran comercialmente disponibles y que requieren los métodos para posteriores experimentos de microarreglos. Con el propósito de obtener cantidades suficientes de ARN para experimentos de microarreglos, se lleva a cabo una amplificación de ARN lineal. En resumen, este método involucra rondas posteriores de síntesis de ADNc y de ARNa, que amplifican la cantidad original 20 - 30 veces por ronda. Se amplifican y marcan 90 muestras de ARN. Los ARNa se hibridan con un chip HG U95A v2 de Affymetrix que contiene sondas de oligonucleótido de aproximadamente 12.000 genes humanos y se analizan.

#### 20 Homogenización de tejido

Todas las muestras de las biopsias congeladas en forma instantánea en nitrógeno líquido se almacenan en criotubos a -80°C. Inmediatamente después de la adición de 700 µl de amortiguador de homogenización (amortiguador de lisis ABI/PBS 1:1) se lleva a cabo la etapa de homogenización sumergiendo la varilla de un homogenizador de rotor/estator Polytron PT 3100 dentro del tejido que contiene amortiguador y poner a funcionar el homogenizador a velocidad máxima durante 30 segundos. Si después de este tiempo son visibles piezas de tejido residuales, se repite el procedimiento hasta lograr homogeneidad. Después de esto se almacena el homogeneizado a -80°C hasta que se utiliza en la etapa de extracción del ARN.

#### Filtración previa del homogeneizado y extracción del ARN

La filtración previa el homogeneizado y las extracciones de ARN se llevan a cabo por medio de la estación de trabajo Biorobot ABI 6700 (Applied Biosystems, EUA). Se colocan los homogeneizados de tejido en los pozos de una placa de 96 pozos profundos, y se colocan en posición de filtrado de la estación de trabajo 6700. Se coloca una bandeja de filtración previa del tejido en el carro de purificación y se asegura en esa posición. Se cierra la puerta del instrumento, y se pone a funcionar el software de la estación de trabajo.

El procedimiento de extracción del ARN incluye una etapa de transferencia de la muestra, una etapa de filtración, una etapa de lavado, y una etapa de elusión. La etapa de transferencia de la muestra, en la cual se transfiere un homogeneizado previamente filtrado desde la placa de 96 pozos profundos hasta la bandeja de purificación del ARN incluye una transferencia primaria de una solución de 550 µl. Antes de la segunda transferencia, se añaden 150 µl de amortiguador de homogenización (amortiguador de lisis ABI/PBS 1:1) a cada pozo en la placa de pozos profundos, se mezcla tres veces y luego se transfieren 150 µl de allí hasta la bandeja de purificación. La etapa de filtración se realiza por medio de la aplicación de una presión de vacío del 80% durante 180 segundos. Las etapas de lavado se realizan de la siguiente forma:

Etapa 1: solución de lavado 1, 400 µl, presión de vacío del 80% durante 180 segundos, dos veces;

Etapa 2: solución de lavado 2, 500 µl, presión de vacío del 80% durante 180 segundos, una vez;

Etapa 3: solución de lavado 2, 300 µl, presión de vacío del 60% durante 120 segundos, dos veces.

Se aplica un vacío de elusión previo de 90% de presión durante 300 segundos. Después de eso se realiza la etapa de elusión por medio de la adición de 120 µl de solución de elusión (Applied Biosystems), y la aplicación de una presión de vacío del 100% durante 120 segundos. Se recolectan las muestras de ARN en placas de 96 pozos (Applied Biosystems). Se dividen los eluatos en dos alícuotas de igual volumen.

Se almacena una alícuota a -80°C, se utiliza la otra alícuota para la amplificación del ARN y el análisis por GeneChip.

## Amplificación del ARN

Antes del procedimiento de amplificación del ARN, se tratan todos los eluatos de ARN con la química del kit RNeasy (Qiagen) para limpiar adicionalmente al ARN de sales residuales u otras sustancias que puedan inhibir la eficiencia de la amplificación. Se ajusta el volumen de la alícuota hasta 100 µl con agua libre de ARNasa. Se añaden 350 µl del amortiguador RLT y se mezcla bien. Se añaden 250 µl de etanol (96 - 100%), y se mezcla bien. Se aplica la muestra (700 µl) a una columna mini RNeasy, se la coloca en un tubo de recolección de 2 ml. Después de una etapa de centrifugación de 15 segundos a más de 10.000 rpm se descarta el flujo. Se transfiere la columna de RNeasy a un nuevo tubo de recolección. Se pipetea 500 µl de amortiguador RPE sobre la columna, se cierra el tubo y se centrifuga durante 15 segundos a más de 10.000 rpm para lavar la columna. Se descarta el flujo. Se añaden otros 500 µl de amortiguador RPE a la columna y se centrifuga el tubo durante 2 minutos a más de 10.000 rpm para secar la membrana de gel de sílice. Para eluir, se transfiere la columna de RNeasy a un nuevo tubo de recolección de 1,5 ml y se añaden 30 µl de agua libre de ARNasa directamente sobre la membrana. Después de 1 minuto de incubación, se centrifuga el tubo durante 1 minuto a más de 10.000 rpm para la elusión. Se repite esta etapa de elusión una vez para obtener un volumen de elusión total de 60 µl. Se cuantifica el ARN por medio del método de Ribogreen (Molecular Probes, Inc., EUA). Se utilizan aproximadamente 10 ng de ARN total de cada muestra en tres rondas de amplificación de ARN.

Todas las enzimas y los amortiguadores para el proceso de amplificación se adquieren de Invitrogen, Inc. (Carlsbad, CA, EUA) a menos que se especifique otra cosa. Se incuban 10 ml de ARN total con 10 pmol del iniciador T7-polydT [5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG(T)<sub>24</sub>] (Genset, Inc.) en un volumen de 11 µl a 70°C durante 10 minutos, luego a 42°C durante 5 minutos. La reacción de la primera cadena se lleva a cabo en un volumen de 20 µl por medio de la adición de 200 unidades de SuperScript II en presencia del amortiguador de la primera cadena, DTT 10 mM, mezcla de dNTP 0,5 mM, y 1 µl del inhibidor de ARNasa (Ambion, Inc.) con una incubación a 42°C durante 1 h. La síntesis de la segunda cadena se lleva a cabo en 150 µl con 40 unidades de ADN polimerasa I de E. Coli en amortiguador de la segunda cadena 1x, los dNTP 0,2 mM, 10 unidades de ADN ligasa de E. Coli y 2 unidades de ARNasaH. Después de una incubación de 2 horas a 16°C, los extremos del ADN bicatenario de tornan romos por medio de la adición de 8 unidades de ADN polimerasa T4 durante 10 minutos a 16°C. Se purifica el producto del ADN bicatenario con un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) y eluye en 50 µl de amortiguador de elusión. Para únicamente una ronda de amplificación, se reduce el volumen del eluato hasta sequedad al vacío, se resuspende en 22 µl de agua libre de nucleasa, y luego se utiliza en la reacción de marcación del ARN como se describe más adelante. Para rondas adicionales de amplificación, se reduce el eluato hasta sequedad al vacío, se resuspende en 8 µl de agua libre de nucleasa, y se lo somete a una reacción de transcripción *in vitro* con el kit MEGAscript de Ambion, de acuerdo con las instrucciones del fabricante para un volumen de reacción de 20 µl. Después de incubación durante 3 horas a 37°C se purifica el ARN con el sistema del kit RNeasy (Qiagen). Se eluye el ARN en 30 µl de agua libre de ARNasa, se reduce hasta sequedad al vacío y resuspende en 11 µl de agua libre de nucleasa.

La segunda ronda de amplificación del ARN se inició con la adición de 1 µl de iniciadores hexámeros aleatorios en una concentración de 0,1 mg/ml seguido de una incubación durante 10 minutos a 70°C. Se refrigera la mezcla de reacción sobre hielo y luego se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos, en cuyo momento se inicia la reacción de síntesis de la primera cadena por medio de la adición de 200 unidades de SuperScript II, 20 unidades del inhibidor de ARNasa, los dNTP 0,5 mM y DTT 10 mM en presencia de amortiguador de reacción de la primera cadena. Se incuba la mezcla a 37°C durante 1 hora. Un tratamiento con ARNasa H durante 20 minutos (2 unidades) a 37°C condujo a la degradación del ARN residual. La ARNasa H se inactiva con calor a 94°C durante 2 minutos y se refrigera la mezcla sobre hielo. La síntesis de la segunda cadena se inicia por medio de la adición de 100 pmol del iniciador T7-polydT (véase más arriba) e incubación a 70°C durante 5 minutos, seguido por 42°C durante 10 minutos. La síntesis de la segunda cadena se realiza como se describió anteriormente, y se purifica el ADNc con el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen). Si esta es la ronda final de amplificación, se reduce el volumen del eluato hasta sequedad al vacío y se resuspende en 22 µl de agua libre de nucleasa, seguido por un procedimiento de marcación del ARN *in vitro* (véase más adelante).

Se prepara una tercera ronda de amplificación por medio de la reducción del eluato hasta sequedad al vacío y se resuspende en 8 µl de agua libre de nucleasa antes de ser sometida luego a un procedimiento idéntico a aquel de una segunda ronda de amplificación. Se observó un incremento de 15 a 30 veces en ARNa en cada ronda de amplificación, dando como resultado una amplificación de  $5 \times 10^5$  a  $1,9 \times 10^6$  veces del ARN mensajero después de tres rondas (asumiendo 3,3% de ARN con cola poli(A)+ dentro del fondo común inicial de ARN total). Los ARN marcados se fraccionan a 94°C durante 35, 25, ó 20 minutos para los ARN amplificados una vez (1x), dos veces (2x) o tres veces (3x), respectivamente. Se escogen períodos de incubación más cortos para ARN 2x y ARN 3x para evitar degradación completa del ARN.

La etapa de biotilación del ARN implica el uso del kit de marcación de ARN de alto rendimiento (Enzo Diagnostics, NY, EUA; P/N 900182) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se mezclan los siguientes ingredientes en una etapa inicial:

22 µl de ARNa,

4 µl de amortiguador de reacción HY 10X,

4 µl de ribonucleótidos marcados con biotina 10X,

4 µl de DTT 10X,

5 4 µl de mezcla del inhibidor de ARNasa,

2 µl de ARN polimerasa T7.

Se incuba la mezcla a 37°C durante 3 - 4 horas. Se purifica el ARNa marcado utilizando química RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones el fabricante. El volumen de elución es de 60 µl, se usan 2 µl para determinar espectrofotométricamente la concentración de ARN por medio de la absorbancia a 260 nm.

## 10 Fragmentación del ARN

Se fragmentan 15 µg de ARNa marcado en un volumen de 20 µl por medio de la adición de 4 µl de amortiguador de fragmentación MES 5X y agua libre de ARNasa. Se incuba la mezcla durante 20 minutos a 94°C.

Amortiguador de fragmentación MES 12X (para 1000 ml):

15 70,4 g ácido libre de MES (MES 1,22 M, sal sódica de MES, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico [Na<sup>+</sup>] 0,89 M (SIGMA, P/N M5287)

193,3 g sal sódica de MES (sigma, P/N M3885)

800 ml agua DEPC

Se filtra a través de un filtro de 0,2 µm, el pH debe estar entre 6,5 y 6,7 sin ajustar.

Mezcla de hibridación de microarreglos

20 La hibridación se lleva a cabo en un volumen de 300 µl. Se mezcla el ARNa fragmentado con 150 µl de amortiguador de hibridación MES 2X, 3 µl de esperma de arenque (10 mg/ml), 3 µl de BSA (50 mg/ml), 3 µl de oligonucleótido de control 948b (5 nM) y 3 µl de controles de hibridación eucariotas 20X (Affymetrix). Se añade agua DEPC hasta 300 µl de volumen final.

Amortiguador de hibridación MES 2X (para 500 ml):

25 217 ml agua DEPC

200 ml NaCl 5 M

82 ml MES 12X

Filtración a través de filtro de 0,2 µm.

Luego se añade: 1,0 ml de Triton X-100 al 10%. Se almacena a temperatura ambiente.

## 30 Tratamiento previo del microarreglo

Se incuba el microarreglo a 45°C durante 15 minutos. Se llena la cámara del arreglo con solución para tratamiento previo recientemente preparada, precalentada a 45°C.

Solución para tratamiento previo (300 µl por microarreglo)

294 µl amortiguador de hibridación MES 1X

35 3 µl BSA acetilada (50 mg/ml) (Gibco BRL Life Technologies, P/N 15561-020)



3 µl ADN de esperma de arenque (10 mg/ml) (Promega/Fisher Scientific, P/N D1811)

#### Hibridación del microarreglo

- 5 Mientras los microarreglos están siendo tratados previamente a 45°C, se incuba la mezcla de hibridación a 99°C durante 5 minutos. Después de una centrifugación durante 5 minutos a 14.000 rpm se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf y se incuba a 45°C durante 5 minutos. Se remueve la solución de tratamiento previo de la cámara del microarreglo y se reemplaza con la mezcla de hibridación, evitando las burbujas. Los tapones del cartucho plástico se recubren con cinta y se coloca el cartucho en un horno a 45°C con el frente de vidrio hacia abajo. Se continúa la hibridación durante 16 a 18 horas.

#### Procedimiento de lavado

- 10 Se remueve la mezcla de hibridación del arreglo de la sonda y se pone aparte en un tubo de microcentrífuga. Se añaden 280 µl de amortiguador de hibridación MES 1X a la cámara y se realiza un lavado de fluidos en una Estación de Fluidos modelo 400 de GeneChip utilizando un amortiguador SSPE-T 6X.

Amortiguador de lavado SSPE-T 6X (1000 ml)

300 ml de SSPE 20X (BioWhittaker, P/N 16-010Y)

- 15 699 ml de agua

Se filtra a través de un filtro de 0,2 µm. Se añade 1 ml de Triton X-100 al 10%.

Después del lavado e fluidos, se remueve el amortiguador SSPE-T de la cámara y se llena con amortiguador de lavado severo, evitando las burbujas.

Amortiguador de lavado severo (1000 ml):

- 20 83,3 ml de amortiguador MES 12X

5,2 ml de NaCl 5 M

1 ml de Tween 20 al 10%

910,5 ml de agua

Se filtra a través de un filtro de 0,2 µm. Se añade 1 ml de Triton X-100 al 10%.

- 25 Se colocan boca arriba los cartuchos de microarreglos en un horno para incubación a 45°C durante 30 minutos. Se remueve el amortiguador severo y se enjuaga el arreglo con 200 µl de amortiguador de hibridación MES 1X. Se remueve completamente el amortiguador de hibridación MES 1X, se llena la cámara del arreglo con colorante SAPE, y se incuba a 37°C durante 15 minutos.

Coloración SAPE (600 µl):

- 30 300 µl amortiguador de hibridación MES 2X

288 µl agua

6 µl BAS (50 mg/ml)

6 µl SAPE (1 mg/ml) (Molecular Probes, P/N 15230-147)

- 35 Después de 15 minutos se remueve la solución colorante SAPE, se llena la cámara con 200 µl de amortiguador de hibridación MES 1X, y se realiza un lavado de fluidos. Se remueve la solución SSPE-T de la cámara del microarreglo y se la reemplaza con 300 µl de colorante AB.

Colorante AS (300 µl):

150 µl amortiguador de hibridación MES 2X

146,25 µl	agua
3 µl	BAS (50 mg/ml)
0,75 µl	anticuerpo biotinilado (500 µg/ml) (Vector Laboratories, P/N BA-0500)

5 Se incuba el cartucho a 37°C durante 30 minutos, se reemplaza el colorante AB con 200 µl de amortiguador de hibridación MES 1X, y se realiza un lavado de fluidos. Después de la etapa de lavado, se remueve la solución de SSPE-T, se llena la cámara con colorante SAPE, y se incuba a 37°C durante 15 minutos. Se reemplaza el colorante SAPE con 200 µl de amortiguador de hibridación MES 1X, y se realiza un lavado de fluidos. Se cubren los tapones con cinta para evitar una fuga de amortiguador.

10 Se escanean los microarreglos sobre escáneres GeneArray® de Affymetrix. Los conjuntos de datos sin procesar se normalizan por escalado de la función cuantil del 75% de todos los grupos de sondas de cada chip hasta una intensidad objetivo de 200.

#### Método de separación

15 El análisis estadístico se realiza con S-Plus (Insightful, Inc., EUA) y GeneSpring® (Silicon Genetics, EUA). Los valores promedio de las diferencias menores a 10 se redondean en 10. Los niveles de expresión bajos (entre 10 y 50) se mantienen para garantizar que no se pierda ningún patrón posible. Se aplican estadísticas paramétricas y no paramétricas estándar (prueba t de Student, prueba de la suma de rangos de Wilcoxon).

20 Más particularmente, se desarrolla un algoritmo para separar los datos para un gen particular para el CR y el grupo de control, haciendo una distinción entre el grupo de CR que tiene valores de expresión menores que el grupo de control y el grupo de CR que tiene valores de expresión mayores que el grupo de control. Además de tener rangos de expresión separados, la brecha de separación entre los grupos se maximiza. De este modo la brecha entre un cuantil especificado (Q) de los 2 grupos de datos (es decir, el cuantil 1-α del grupo con niveles de expresión menores y el cuantil α del grupo con niveles de expresión mayores con  $0 < \alpha < 0,5$ ).

La estadística para medir qué tan bien separa cada gen los dos grupos se expresa como

$$S = \text{máx.} (q_{\alpha, cr} - q_{1-\alpha, control}, q_{\alpha, control} - q_{1-\alpha, cr}, 0)$$

25 en donde  $q_{\alpha, cr}$  se refiere el cuantil α del grupo de CR con  $0 < \alpha < 0,5$  (y por lo tanto  $1 - \alpha > 0,5$ ). En forma similar, control o cr se refiere al grupo de control.

El 0 se añade a la evaluación de S debido a que ambos términos,  $q_{\alpha, cr} - q_{1-\alpha, control}$ , y  $q_{\alpha, control} - q_{1-\alpha, cr}$  pueden ser negativos. En este caso, la medición de la diferencia no tiene ningún sentido, ya que los grupos se superponen demasiado. En otras palabras, el cuantil 1-α de uno de los grupos debe estar por debajo del cuantil α del otro.

30 Se utiliza un algoritmo con los siguientes ajustes:

- El umbral (o ruido) se fija en  $T = 10$ .

- El umbral (o expresión mínima) se fija en  $T_2 = 50$ .

- El porcentaje mínimo de señales por encima del umbral  $T_2$  se fija en cada grupo para  $P = 40\%$ .

35 - El porcentaje mínimo de señales por encima del umbral  $T_2$  sobre todos los grupos combinados se fija para  $P = 50\%$  (de tal manera que un porcentaje mayor en un grupo pueda compensar de alguna manera un porcentaje menor en el otro grupo).

- El porcentaje de señales por debajo de  $T_2$  se determina para cada gen, individualmente para cada grupo (CR, control).

- Todos los genes que no cumplen con todos los umbrales de porcentaje mínimo se descartan.

40 - La estadística S se calcula para cada gen.

- Los genes con  $S > 0$  se devuelven, ordenados por S.

Como un primer filtro de paso, se excluyen todos los genes que contienen una proporción muy grande de señales bajas. Se incluye un gen en el conjunto de datos si

- ambos grupos, CR y el de control, contienen al menos valores del 40 por ciento por encima del umbral  $T_2 = 50$  (al menos 4 de 8 y 4 de 9 muestras).

5 - el conjunto de datos combinados contiene al menos valores del 50 por ciento por encima del umbral  $T = 10$  (al menos 9 de 17 muestras).

En una segunda pasada, todos los valores de expresión por debajo de 10 se fijan en 10 para reducir la variación aleatoria.

10 (El algoritmo de Affymetrix utilizado para derivar los niveles de expresión puede generar valores negativos). Se prefieren los niveles bajos (entre 10 y 50) para garantizar no perder ningún patrón que pueda presentarse.

En GeneSpring™, se normaliza cada gen por sí mismo por medio de la creación de un control positivo sintético para ese gen, que es el promedio de todos los valores de ese gen en un conjunto de datos, y dividiendo todas las mediciones para ese gen por medio de este control positivo, asumiendo que es al menos de 0,01.

Diseño de iniciadores y la sonda TaqMan

15 Los ensayos con TaqMan deben ser diseñados para la región de un gen que hibrida con el correspondiente grupo de sondas del microarreglo HG-U95Av2. Esta región se llama secuencia objetivo. Utilizando el software Netaffx™ (Affymetrix, Inc.), se identifica la secuencia objetivo de un grupo de sondas. La secuencia objetivo es luego importada dentro de programa Primer Express (Applied Biosystems), y la selección del iniciador/sonda se realiza por medio del programa con las siguientes condiciones:

20 El iniciador TM (temperatura de fusión) debe estar entre 58°C y 60°C. En forma óptima, debe ser de 59°C, con una diferencia máxima de TM de 2°C.

El contenido de GC del iniciador (GTP, CTP) debe estar entre 20% como mínimo y 80% como máximo, evitando cualquier de las abrazaderas de GC 3'.

La longitud óptima del iniciador debe ser de 20 residuos, pero puede estar en el rango desde 9 hasta 40 residuos.

25 Los requerimientos del amplicón deben ser que el TM mínimo sea de 0°C, el TM máximo de 92°C. El amplicón deben tener una longitud mínima de 50 residuos, una longitud máxima de 150.

30 Los criterios de la sonda TaqMan son que la TM de la sonda debe ser al menos de 0°C superior a la TM del iniciador de la PCR, y la sonda no debe iniciar con un residuo G (GTP). Si la secuencia objetivo es muy corta para identificar cualquier ensayo de TaqMan que cumpla con los criterios mencionados anteriormente, la secuencia se alinea con la secuencia completa del gen (utilizando un software estándar tal como GCG, Wisconsin Package, Accelrys, San Diego, CA) y se selecciona un tramo más largo de ADN, que abarca la secuencia objetivo. Las secuencias del iniciador hacia delante, del iniciador inverso y de la sonda TaqMan para cada gen se enlistan en la Tabla 4.

35 Para identificar los genes que separan mejor al grupo de rechazo crónico del grupo de control, se aplican técnicas estándar, por ejemplo las estadísticas t y de Wilcoxon, y se incluye la medición recientemente derivada para encontrar grupos bien separados (con una gran brecha de separación entre ellos).

40 La medición (Q15/85 y Q20/80) extiende el concepto de separación hasta encontrar una buena brecha de separación. Se basa en la medición de la distancia entre el cuantil  $\alpha$  del grupo de CR y el cuantil  $(1-\alpha)$  del grupo de control y viceversa. Si los rangos  $(\alpha, 1-\alpha)$  de ambos grupos no se superponen, se reporta la distancia máxima, de lo contrario es 0. La aplicación de las mediciones a cada gen en forma individual suministra una medida para la separación de los 2 grupos. El método Q20/80 identifica 65 genes y el método Q15/85 16 genes con separación completa de los rangos de cuantil (20%, 80%) y (15%, 85%), respectivamente.

La comparación de los genes detectados con la estadística ordenada t y de Wilcoxon identificó que 10 de esos genes están en un rango entre los 100 con la estadística más extrema t y de Wilcoxon. Los identificadores génicos y las anotaciones se suministran, por ejemplo, en la tabla 3.

45 Casi todos los genes identificados muestran niveles de expresión por encima del umbral bajo de 50, preferiblemente incluso mucho mayor.

5 Aplicando una forma diferente de evaluar la potencia de un grupo de genes para separar los dos grupos de muestras, un análisis de conglomerados de todos los 65 genes que son comunes a ambos, se realiza la lista estadística t y la lista de Wilcoxon. Se prepara el conglomerado en dos etapas. Primero, se prepara un conglomerado de genes por medio de correlación estándar, luego un conglomerado de un arreglo por medio de la correlación de Pearson.

10 Para elaborar un árbol, GeneSpring calcula la correlación para cada gen con cada uno de los otros genes en el grupo. Luego toma la correlación más alta y aparea esos dos genes, promediando sus perfiles de expresión. GeneSpring compara luego este nuevo gen compuesto con todos los otros genes no apareados. Esto se repite hasta que todos los genes se han apareado. En este momento entran en juego la relación entre la distancia mínima y la separación. Ambas afectan el comportamiento de ramificación del árbol. La distancia mínima trata con qué tan abajo se representan las ramificaciones discretas del árbol. El número especificado en la caja de distancia mínima determina la separación mínima considerada significativa entre genes. Esto reduce la estructura sin sentido en la base del árbol. La disminución de la distancia mínima incrementa la 'frondosidad' del árbol. La distancia mínima predeterminada es 0,001. Un valor menor a 0,001 tiene muy poco efecto, debido a que la mayoría de los genes no están correlacionados más estrechamente que eso. Un número mayor tenderá a englobar juntos más genes en un grupo, haciendo los grupos menos específicos.

20 Este número debe estar entre 0 y 1. Esta relación de separación determina qué tan grande tiene que ser la diferencia de correlación entre los grupos de los genes agrupados para que se considere a los grupos como grupos discretos y que no se unieron. El incremento de la separación incrementa la 'frondosidad' del árbol. La relación de separación predeterminada es de 0,5, pero puede estar en el rango de 0,0 a 1,0. Con una relación de separación de 0, todos los perfiles de expresión génica pueden ser considerados como idénticos.

25 La correlación de Pearson es muy similar a la correlación Estándar, excepto porque mide el ángulo de vectores de expresión para los genes A y B alrededor del promedio de los vectores de expresión (por ejemplo, la media de los valores de expresión que constituyen los perfiles para el Gen A y el Gen B). Generalmente el promedio de los vectores de expresión será positivo ya que los valores de expresión se basan en las concentraciones del ARNm. Utilizando la correlación de Pearson se obtienen correlaciones más negativas que a partir de la correlación Estándar. Vale la pena señalar que la correlación de Pearson produce casi las mismas correlaciones que la correlación estándar cuando se realizan ambas sobre los logaritmos de los valores de expresión de los genes. Esta es la forma de calcular una correlación de Pearson: se calcula el promedio de todos los elementos en el vector a. Luego se resta ese valor de cada elemento en a. Al vector resultante se lo llama A. Se hace lo mismo para b para elaborar un vector B. Correlación de Pearson =  $A \cdot B / (|A| |B|)$ .

35 La agrupación de genes se prepara llevando a cabo un análisis de correlación estándar con un valor de relación de separación de 0,5 y un valor de distancia mínima de 0,001. Para la agrupación de microarreglos se utiliza una correlación de Pearson con una relación de separación de 0,1 y un valor de distancia mínima de 0,001. Por lo tanto, el grupo de 65 genes separa perfectamente los dos grupos de pacientes. La distancia entre los dos grupos es más bien pequeña. Esto era esperado ya que todos los pacientes eran clínica e histológicamente sanos en el momento en que se tomaron estas biopsias.

40 Por medio de la aplicación del método anterior se hizo seguimiento a los niveles de expresión de aproximadamente 12.000 transcripciones en las biopsias del protocolo de aloinjerto renal serial de 17 pacientes trasplantados. Las características clínicas y demográficas de todos los pacientes en este estudio se enlistan en la Tabla 5. Un grupo de pacientes desarrolló CR en el lapso de 6 meses desde el momento en que se tomó la biopsia, el otro no lo hizo. Utilizando un grupo de genes como el divulgado, preferiblemente un grupo de 10 genes como el indicado en la Tabla 3, como el identificado por medio de análisis estadístico detallado de los perfiles de expresión de ARN de la biopsia, se predijo la ocurrencia/no ocurrencia de rechazo crónico en 15 de estos 17 pacientes (> 88%). Además, el grupo de gens discriminadores fue también capaz de predecir que una biopsia tomada el mes 12 pertenecía a un paciente que desarrolló CR hasta el mes 18.

Tabla 1: Lista de genes (con los números de acceso del GenBank) que son más activos en el grupo previo al CR

Número de acceso del GenBank	Grupo de sondas Affymetrix	descripción	veces que cambia	valor p de Wilcoxon	valor p de la prueba t
X07696	37582_at	citoqueratina 15 / KRT15	7,96	0,0003	0,0192
AB005666	36843_at	Proteína que activa la GTPasa	6,93	0,0064	0,0284

U65785	33863_at	ARNm de ORP150	6,54	0,0193	0,0051
M16937	37618_at	proteína de homeobox c1 / hoxB7	5,73	0,0009	0,0197
Z37166	35292_at	ARNm de BAT1 (familia DEAD)	5,50	0,0266	0,0163
U48231	33549_at	receptor de bradiquinina B1	4,88	0,0030	0,0108
U77968	34652_at	miembro de la familia bHLH-PAS	4,55	0,0047	0,0059
AJ000480	35597_at	fosfoproteína C8FW	4,30	0,0046	0,0089
AF040708	40499_r_at	NPRL2 / similar a la nitrógeno permeasa NPR2 de levadura	4,28	0,0041	0,0058
AJ011497	38482_at	claudina-7	4,34	0,0193	0,0044
Z70519	37644_s_at	exón 4 perdido en el gen FAS	4,41	0,0064	0,0103
U41635	36996_at	OS-9	2,70	0,0011	0,0388
U45448	33535_at	canal iónico que depende de ATP	2,69	0,0104	0,0167
AB010414	39893_at	gamma 7 para proteína G	2,54	0,0030	0,0186
X98411	35132_at	miosina-IF	2,47	0,0152	0,0240
AB011082	36408_at	ORCTL4	2,38	0,0289	0,0230
X63546	1613_s_at	oncogén tre	3,05	0,0068	0,0048
S80864	35955_at	proteína putativa	3,01	0,0289	0,0189
A1827895	36224_g_at	IMAGE:2350347	2,98	0,0152	0,0406
U13897	40246_at	homólogo humano de proteína de gran tamaño de discos de Drosófila	2,88	0,0071	0,0072
U16799	37669_s_at	subunidad beta-1 de ATPasa de Na,K	2,88	0,0211	0,0163
X14445	1855_at	int-2 (FGF-3)	2,92	0,0107	0,0406
A1653621	36992_at	tiorredoxina	3,12	0,0101	0,0108
U79251	41093_at	OBCML, tipo proteína de enlazamiento de opiáceos/molécula de adhesión celular	3,48	0,0047	0,0166

(continuación)

Número de acceso del GenBank	Grupo de sondas Affymetrix	descripción	veces que cambia	valor p de Wilcoxon	valor p de la prueba t
M59818	34223_at	receptor del factor de estimulación de colonias de granulocitos (GCSFR-1)	3,58	0,0095	0,0310
D11086	1506_at	cadena gamma del receptor de interleuquina 2	3,71	0,0149	0,0146
NM002893	1515_at	proteína 7 de enlazamiento de retinoblastoma	4,01	0,0106	0,0281
AL049449	33997_at	DKFZp586B1722	4,08	0,0107	0,0333
AL049228	31985_at	DKF7p564N1716	4,10	0,0249	0,0228
X64116	32698_at	receptor de poliovirus	1,92	0,0107	0,0134
S85655	36592_at	prohibitina	1,94	0,0152	0,0098
W26469	31377_r_at	sub-biblioteca preparada en forma aleatoria de EST ID 32f4	2,23	0,0152	0,0208
AB020638	33226_at	KIAA0876	2,25	0,0152	0,0402

5

Tabla 2: Lista de genes (con los números de acceso del GenBank) que son desactivados tempranamente en el grupo previo al CR

Número de acceso del GenBank	Grupo de sondas Affymetrix	descripción	veces que cambia	valor p de Wilcoxon	valor p de la prueba t
U56637	40910_at	isoforma 1 de la subunidad alfa de la proteína de recubrimiento	4,16	0,0010	0,0036
D14110	1276_g_at	proteína de enlazamiento de ARN	3,76	0,0030	0,0135
M24194	34609_g_at	homóloga; putativa (proteína G)	3,71	0,0046	0,0168
X56777	39720_g_at	ZP3	3,48	0,0095	0,0301
U94747	38171_at	proteína de repetición WD; similar a AN11 de petunia	3,49	0,0172	0,0282
AB018313	39130_at	KIAA0770	3,47	0,0211	0,0469
U66059	32795_at	locus beta del receptor de la célula T	3,30	0,0203	0,0410
M93651	40189_at	gen SET	5,97	0,0028	0,0141
AJ005814	40343_at	hoxA7	5,03	0,0055	0,0549

(continuación)

Número de acceso del GenBank	Grupo de sondas Affymetrix	descripción	veces que cambia	valor p de Wilcoxon	valor p de la prueba t
X75861	33988_at	TEGT	5,27	0,0071	0,0470
X78947	36638_at	Factor de crecimiento del tejido conectivo	5,22	0,0208	0,0489
L05095	31708_at	proteína ribosomal L30	10,83	0,0211	0,0579
U52112	31873_at	homólogo de la subunidad	3.01	0.0046	0.0106
AF031416	35960_at	IKK beta	3.03	0.0149	0.0076
M31661	1079_g_at	receptor de prolactina (PRL)	3.09	0.0180	0.0231
Z25749	34646_at	proteína ribosomal S7	2.95	0.0072	0.0185
AF034176	32218_at	cóntigo del clon ntcon5	2.87	0.0106	0.0285
U90904	38452_at	clon 23773	2.87	0.0104	0.0430
D38048	39060_at	subunidad z del proteasoma	2.80	0.0193	0.0356
A1743134	41246_at	similar al precursor de nexina derivado de glía	2.81	0.0212	0.0383
U66078	33972_r_at	DAZLA	2.58	0.0048	0.0053
AB023154	35369_at	KIAA0937	2.66	0.0072	0.0133
AI540925	41206_r_at	ADNc de PEC1.2_15_A02.r	2.26	0.0072	0.0145
U07132	519_g_at	receptor de la hormona esteroide Ner-I	2.29	0.0149	0.0267
AA527880	35774_r_at	NDUFB7	2.38	0.0152	0.0356
AI828210	38592_s_at	IMAGE:2421832	2.35	0.0212	0.0165
U77327	32970_f_at	CD30	1.82	0.0107	0.0211
U40282	35365_at	quinasa enlazada a integrina	1.80	0.0212	0.0154
AF029778	32137_at	mellado 2 (ligando Notch)	1.84	0.0289	0.0422
M92287	1795_g_at	ciclina D3 (CCND3)	1.89	0.0289	0.0193
AF042379	39918_at	GCP2	2.00	0.0107	0.0205
X56468	409_at	14.3.3tau	2.12	0.0152	0.0210

Tabla 3: Subconjunto de 10 genes de las tablas 1 y 2 con los patrones de expresión diferencial más significativos para el grupo previo al CR y el de control. El patrón de expresión de ocho genes se valida por medio de Q-PCR en tiempo real con TaqMan™. nd: no se hizo debido a información limitada de la secuencia.

número de acceso	nombre	descripción	veces que cambia (HG-U95)	veces que cambia (Q-PCR)
con mayor actividad en el grupo previo al CR en el mes 6				
X07696	KRT15	proteína estructural del citoesqueleto	7,96	2,36
M16937	hoxB7	familia del homeodominio de proteína de enlazamiento de ADN	5,73	2,55
AF040708	NPRL2	proteína del gen 21 supresora del tumor candidato	4,28	4,60
U41635	OS9	fosfoproteína nuclear ácida (rica en leucina)	2,70	4,20
AB010414	γ7 para proteína G	proteína de enlazamiento de nucleótido guanina	2,54	4,99
U79251	OBCML	miembro de la súper familia de la proteína inmunoglobulina	3,48	20,89
AL049449	DKFZp5586B1722	no caracterizado	4,08	4,21
W26469	EST ID 32f4	no caracterizado	2,23	nd
con menor actividad en el grupo previo al CR en el mes 6				
AJ005814	hoxA7	factor de transcripción del homeodominio	-5,03	1,86
M31661	PRLR	receptor de prolactina	-3,09	-32,31

5 Tabla 4: Secuencias y etiquetas de todas las sondas e iniciadores utilizados en los ensayos con TaqMan™.

# de acceso del GenBank	Nombre	Secuencia
X07696	KRT15	5'-GGCTTTGCATGCGCTCTATT-3'
		5'-GCTGCATCTCCTTGCTCCA-3'
		5'-FAM-CCCCTCTGCCTCTCCCCACCTTC-TAMRA-3'
M16937	HoxB7	5'-GGAGCCCCAAAACCTACCA-3'
		5'-AAGCAAGAAGCAGCAGCCA-3'
		5'-FAM-TCGCGTGTTCCCCAAGCGC-TAMRA-5'



(continuación)

# de acceso del GenBank	Nombre	Secuencia
AF040708	NPR2	5'-TGGGAGTTACCTGAGGGAAGC-3' 5'-GATTGGCAGTGCCCCATG-3' 5'-FAM-AGACCCTTTATGTCTCTCAGGAGCCCTGGA-TAMRA-3'
U41635	OS9	5'-GCAAGGAGGGCAGGACACT-3' 5'-CAAACATCACTAAGGGCAGGTG-3' 5'-FAM-CAGGCACTGAGCAAGCAGGCC-TAMRA-3'
AB010414	proteína G γ 7	5'-TGGCCTTCTCAGTTTGGGC-3' 5'-TTCAGTTATTCCGAACGGGAA-3' 5'-FAM-AAAGGGATGGAGGCTTACGGCCA-TAMRA-3'
U79251	OBCML	5'-CTGAGCCACCTTTGCTGTCTT-3' 5'-TTTGAATCCCAGGCAACTTTG-3' 5'-FAM-TCTCCTGGGACGAGAAGGACTCATCCA-TAMRA-3'
AL049449	DKFZp586B1722	5'-AACTTGCCAATTCTGTGAATGTTATT-3' 5'-GGGACATGTTACCCAATCACAA-3' 5'-FAM-ATTTAAAAAGCTGGGTCTGTAATGGGAGGCATTTAMRA-3'
AJ005814	HoxA7	5'-TGGAAATTCTGCTCACTTCTTGC-3' 5-TCTGATGTCATGGCCAAATTTG-3' 5'-FAM-CTTGCTTGCTTCTCTGGTGGGCTTCC-TAMRA-3'
M31661	PRLR	5'-GACACTACTAAAGCTCCCAGCTCC-3' 5'-TTCTGGAATCAGCTGCTGGA-3' 5'-FAM-TTCATGCTCCATTTTAACCACTTGCCTCTT-TAMRA-3'

Tabla 5: Demografía de los receptores y de los donantes.

		receptiente					Donador					
paciente	edad	género	origen étnico	enfermedad renal en fase terminal	AR	diagnóstico histológico el mes 12	clasificación BANFF	edad	género	origen étnico	tipo de tx	HLA falta de correspondencia en el loci A-8DR
A	41	F	Ot	GN/GD	1	1	suave	22	M	ot	CadHB	1-1-2
B	27	M	Ca	GN/GD	0	1	suave	26	F	Ca	LivUnrel	1-2-2
C	42	M	Ca	DM	0	1	suave	39	F	Ca	CadHB	1-1-0
D	62	M	Ca	GN/GD	1	1	suave	53	M	Ca	CadHB	1-1-1
E	54	M	Ca	GN/GD	0	1	suave	44	F	Ca	CadHB	2-1-2
F	50	M	Ca	otra	0	1	suave	55	F	Ca	LivRet	1-1-1
G	27	M	Ca	otra	0	1	suave	55	F	Ca	Liv rel	1-1-1
H	39	M	Ca	Unkn	0	1	moderada	47	F	Ca	LivUnrel	1-2-2
I	49	F	Ca	PyN/IN	0	1	suave	47	F	Ca	LivUnrel	2-2-1
J	19	F	Bl	Unkn	0	0	ninguna	42	F	Bl	LivRel	1-1-0
K	50	F	Ca	Unkn	0	0	ninguna	23	F	Ca	LivRel	0-0-0
L	53	M	Ca	DM	0	0	ninguna	62	M	Ca	CadHB	1-0-1
M	47	F	Ca	PCKD	1	0	ninguna	51	M	ot	CadHB	2-0-0
N	30	F	Ot	GN/GD	0	0	ninguna	59	M	01	LivRel	0-1-1

(continuación)

paciente				recipiente			Donador					
edad	género	origen étnico	enfermedad renal en fase terminal	AR	diagnóstico histológico el mes 12	clasificación BANFF	edad	género	origen étnico	tipo de tx	HLA falta de correspondencia en el loci A-8DR	
O	37	F	Ca	Htn/Nsc	0	0	ninguna	42	F	Ca	LivRel	1-1-1
P	30	M	Bl	Unkn	1	0	ninguna	27	M	Bl	LivRel	2-2-2
Q	21	F	ot	GN/GD	0	0	ninguna	43	F	ot	LivRel	0-0-0

Receptores A - I desarrollaron CR entre el 6 y el 12 mes, pacientes J - Q permanecieron sanos. AR: número de episodios de rechazo agudo;

Género: F, femenino; M, masculino. Origen étnico: Ot, oriental; Ca, caucásico; Bl, negro. Enfermedad renal en fase terminal: GN/GD, glomerulonefritis/enfermedad glomerular; Pyn/IN, pielonefritis/nefritis intersticial; PCKD, enfermedad renal poliquística; Htn/Nsc, hipertensión/nefroesclerosis; Vsc, vasculitis; DM = diabetes mellitus; OD/R, trastorno obstructivo / reflujo; Unk, origen desconocido. AR: número de episodios de rechazo agudo. Diagnóstico histológico el mes 12: 1, Rechazo crónico positivo; 0, no hay rechazo. Tipo de trasplante: CadHB, latidos de corazón cadavérico; CadNHB, latidos de corazón no cadavérico; LivRel, relacionado con la vida; LivUnrel, no relacionado con la vida.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar rechazo crónico (CR) en un individuo trasplantado *in vitro* que comprende:

- 5 a) detectar como el valor de línea base el nivel de expresión de ARNm correspondiente al gen KRT15, originándose dicho gen de una biopsia de tejido de aloinjerto específico de un individuo de control trasplantado del cual se sabe que no desarrolla CR;
- b) detectar un nivel de expresión de ARNm correspondiente al gen identificado en a) en una biopsia de tejido de aloinjerto renal obtenida de un individuo de prueba que recibió un trasplante de riñón en el lapso de 4 a 7 meses después recibido el trasplante; y
- 10 c) comparar el valor de línea base con el nivel de expresión de ARNm detectada en la etapa b) en donde el valor de la línea base menor al valor del ensayo en el caso de los genes KRT15 predice que el individuo que recibió el trasplante de riñón tiene un mayor riesgo de desarrollar CR.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:

- 15 a) detectar como el valor de línea base el nivel de expresión de ARNm correspondiente al gen hoxB7, NPRL2, OS9,  $\gamma$ 7 para proteína G, OBMCL, DFKZp558B1722, EST ID 32f4, hoxA7 y PRLR, originándose dichos genes a partir de una biopsia de tejido de aloinjerto de un individuo de control trasplantado que se sabe que no desarrolla CR;
- b) detectar un nivel de expresión de ARNm correspondiente a los genes identificados en a) en una biopsia de tejido de aloinjerto de riñón obtenida de un individuo de prueba que recibió un trasplante de riñón en el lapso de 4 a 7 meses después de recibido el implante; y
- 20 c) comparar el valor de línea base con el nivel de expresión de ARNm detectado en la etapa b) en donde el valor de línea base menor al valor del ensayo en el caso de los genes hoxB7, NPRL2, OS9,  $\gamma$ 7 para proteína G, OBMCL, DFKZp558B1722 y EST ID 32f4 y mayor que el valor del ensayo, predice que el individuo que recibió el trasplante de riñón tiene un mayor riesgo de desarrollar CR.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde la biopsia de tejido de injerto se obtiene del individuo de control el día del trasplante.

- 25 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 a 3, en donde en la etapa b), el nivel de expresión de ARNm correspondiente al(a los) gen(es) seleccionado(s) en la etapa a) en una biopsia de aloinjerto renal obtenida de un individuo de prueba que recibió un trasplante de riñón, se detecta alrededor de los 6 meses después de recibido el trasplante.

- 30 5. Un método para hacer seguimiento al CR *in vitro* en un individuo trasplantado en riesgo de desarrollar CR que comprende a) obtener una muestra de un individuo que recibió un trasplante de riñón antes de la administración de un agente que inhiba el CR, b) detectar el nivel de expresión de ARNm correspondiente al gen KRT15 en la muestra previa a la administración, c) obtener una o más muestras posteriores a la administración del paciente que recibió el trasplante de riñón, d) detectar el nivel de expresión de ARNm correspondiente al gen KRT15 en la muestra o las muestras de riñón después de la administración, e) comparar el nivel de expresión de ARNm correspondiente al gen KRT15 en la muestra previo a la administración con el nivel de expresión de ARNm de dicho gen en la muestra o las muestras posteriormente a la administración, y f) ajustar el agente en consecuencia.
- 35

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además:

- 40 a) detectar el nivel de expresión de ARNm correspondiente a los genes hoxB7, NPRL2, OS9,  $\gamma$ 7 para proteína G, OBMCL, DFKZp558B1722, EST ID 32f4, hoxA7 y PRLR, originándose dichos genes a partir de una biopsia de tejido de aloinjerto específico de un individuo de control trasplantado que se sabe que no desarrolla CR;
- b) detectar un nivel de expresión de ARNm correspondiente a los genes identificados en a) en una biopsia de tejido de aloinjerto de riñón obtenida de un individuo de prueba que recibió un trasplante de riñón en el lapso de 4 a 7 meses después de recibido el implante; y
- 45 c) comparar el nivel de la etapa a) con el nivel de expresión de ARNm detectado en la etapa b) en donde el nivel de la etapa a) que es inferior al nivel de la etapa b) en el caso de los genes hoxB7, NPRL2, OS9,  $\gamma$ 7 para proteína G, OBMCL, DFKZp558B1722 y EST ID 32f4 y mayor que el nivel de la etapa b) en el caso de los genes hoxA7 y PRLR, predice que el individuo que recibió el trasplante de riñón tiene un mayor riesgo de desarrollar CR.

7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el nivel de expresión de ARNm de uno o más genes se detecta por medio de técnicas seleccionadas de entre el grupo que consiste de análisis de transferencias tipo Northern, PCR de transcripción inversa y PCR cuantitativo en tiempo real.
- 5 8. El uso del gen KRT15 como biomarcador para rechazo crónico de trasplante de acuerdo con el método de la reivindicación 1.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además los genes hoxB7, NPRL2, OS9,  $\gamma$ 7 para proteína G, OBMCL, DFKZp558B1722, EST ID 32f4, hoxA7 y PRLR.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, como un biomarcador para rechazo crónico de trasplante dentro de los 4 a 7 meses después de recibido el trasplante.
- 10 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 8 a 10, como un biomarcador para rechazo crónico de trasplante alrededor de los 6 meses.