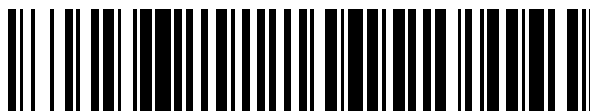


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 490**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2010 E 10382224 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 2418288**

54 Título: **Método para el diagnóstico y pronóstico de tolerancia en transplante de hígado empleando tejido hepático**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2013

73 Titular/es:

**HOSPITAL CLINIC DE BARCELONA (100.0%)
C/ Villarroel, 170
08036 Barcelona, ES y
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
RED DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS Y
DIGESTIVAS (CIBEREHD) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ FUEYO, ALBERTO;
LOZANO SALVATELLA, JUAN JOSÉ;
MARTÍNEZ LLORDELLA, MARC;
RIMOLA CASTELLA, ANTONI y
BOHNE, FÉLIX**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 400 490 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para el diagnóstico y pronóstico de tolerancia en trasplante de hígado empleando tejido hepático

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención hace referencia al campo de la medicina humana. Más específicamente, la presente invención se centraliza en un método para el diagnóstico *in vitro* o el pronóstico del estado de tolerancia de un paciente sometido a un trasplante de hígado, el cual comprende la medición de los niveles de expresión, *in vitro*, en muestras de tejido hepático, de al menos uno de los siguientes genes o combinaciones de los mismos: *TFRC*, *CDHR2*, *HMOX1*, *MIF*, *HAMP*, *IFNG*, *PEBP1*, *SLC5A12*, *ADORA3* y *DAB2*.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La supervivencia a largo plazo de los injertos trasplantados depende de forma crítica de la administración de larga duración de fármacos inmunosupresores para prevenir el rechazo del injerto. Estos fármacos son muy efectivos para la prevención del rechazo del injerto, pero están también asociados a graves efectos secundarios, como la nefrotoxicidad, y a un riesgo aumentado de infecciones oportunistas y tumores, y complicaciones metabólicas como la diabetes, la hiperlipidemia y la hipertensión arterial. Debido a los efectos secundarios de los fármacos inmunosupresores, la inducción de la tolerancia, definida como un estado en el que el injerto mantiene una función normal en ausencia de inmunosupresión crónica, es uno de los principales objetivos de la investigación en la inmunología del trasplante. La inducción de la tolerancia es posible en un gran número de modelos de trasplante en roedores. Sin embargo, la aplicación de estos tratamientos experimentales en la práctica clínica ha fallado en gran medida. Una de las razones por las que la aplicación clínica en humanos de tratamientos experimentales de inducción de la tolerancia no ha sido exitosa está relacionada con la falta de una herramienta precisa para el diagnóstico no invasivo de la inducción de la tolerancia en los receptores humanos del trasplante. Publicaciones recientes señalan la necesidad urgente de esta herramienta (N. Najafian et al 2006 y Newell et al. 2006). Por otra parte, se ha detectado ocasionalmente el mantenimiento de la función normal del alotrasplante a pesar de la completa retirada de los fármacos inmunosupresores en trasplantes clínicos de órganos, particularmente después de un trasplante hepático. Los pacientes que espontáneamente aceptan los injertos se consideran convencionalmente como tolerantes "operacionales", y proporcionan una prueba de que la tolerancia inmunológica puede conseguirse realmente en humanos. El trasplante de hígado es el único entorno clínico en el que la tolerancia ocurre espontáneamente en una proporción sustancial de pacientes. De hecho, la retirada completa de la inmunosupresión puede lograrse en alrededor del 21% de los pacientes (Lerut, J. et al 2006). Desafortunadamente, no hay actualmente ningún medio para identificar estos pacientes antes de que se lleve a cabo la retirada de la inmunosupresión. Por esta razón, la completa retirada de los fármacos inmunosupresores raras veces se lleva a cabo en el trasplante de hígado, y así muchos pacientes continúan siendo innecesariamente inmunosuprimidos, con los problemas de salud y económicos que esto acarrea.

40 Algunos intentos anteriores para identificar la tolerancia en el trasplante, principalmente en receptores de riñón e hígado, han empleado bien ensayos funcionales antígeno-específicos o bien análisis no específicos de antígeno. En los ensayos funcionales, se prueban los linfocitos T del receptor con los antígenos del donante tanto *in vitro* como *in vivo* (J. Cai et al 2004), (J. Cai et al 2004) y (E. Jankowska-Gan E et al 2002), (P. Sagoo et al. 2010). Estos ensayos son muy valiosos desde un punto de vista mecanístico, ya que son los únicos análisis capaces de revelar qué rutas son las responsables de la especificidad del estado de tolerancia. Desafortunadamente, estos ensayos son también muy difíciles de llevar a cabo, altamente variables de laboratorio a laboratorio (difíciles de estandarizar), y requieren la disponibilidad de células del donante cuidadosamente criopreservadas. Por estos motivos, los ensayos funcionales no son óptimos para su aplicación clínica generalizada, y se emplean actualmente sólo en laboratorios seleccionados, altamente especializados, y básicamente para fines de investigación.

50 WO 2010/000320 A1 (INST INVEST S BIOMEDIQUESM, 7 January 2010) divulga un método para el diagnóstico o pronóstico *in vitro* del estado de tolerancia de un paciente sometido al trasplante de hígado, que comprende la medición de los niveles de expresión de un grupo de genes en una muestra y la determinación de la tolerancia o no tolerancia del paciente mediante la comparación del nivel de expresión con una muestra de referencia (de un paciente no tolerante al trasplante de hígado).

55 El análisis de monitorización inmune no específico de antígeno constituye una variedad de metodologías dirigidas a la caracterización fenotípica del sistema inmune del receptor, sin el uso de la inmunización con antígenos del donante. Entre estos análisis, se han empleado el estudio del receptor de las células T mediante los patrones de distribución de la longitud de CDR3 (TcLandscape), el inmunofenotipaje de las células sanguíneas periféricas mediante citometría de flujo, y el perfil de expresión génica, para identificar biomarcadores característicos de la tolerancia en humanos. La técnica TcLandscape se ha empleado en sangre periférica para discriminar entre receptores de riñón tolerantes y receptores que experimentan rechazo crónico (S. Brouard et al. 2005). Sin embargo, esta técnica es cara, actualmente sólo está disponible en un laboratorio (Inserm 643 y TcLand Expression en Nantes, Francia), y nunca ha sido validada

en trasplante de hígado. El uso del inmunofenotipaje de sangre periférica se ha utilizado con muestras de sangre periférica obtenidas de receptores tolerantes tanto de trasplante hígado como de riñón. Al menos son conocidos por los inventores cuatro estudios que abordan esta metodología. En el primero de ellos, de la Universidad de Pittsburgh en EE.UU. (G.V. Mazariegos et al 2003), se dice que el ratio entre subgrupos de células dendríticas pDC y mDC podría distinguir entre receptores tolerantes y no tolerantes en trasplante pediátrico de hígado. En el segundo estudio, de Kyoto (Y. Li et al 2004), se dice que un ratio incrementado entre células T gamma/delta delta-1 y delta-2 en sangre periférica es más prevalente en receptores tolerantes de hígado que en los no tolerantes. En el tercer estudio, que fue coordinado por los inventores (Martínez-Llordella et al 2007), se detectó en sangre periférica un número incrementado de células T CD4+CD25+ y un ratio incrementado de células T gamma/delta delta-1 a delta-2 en receptores de hígado tolerantes comparado con los receptores no tolerantes. El valor del ratio entre gamma/delta delta-1 y delta-2 ha sido sin embargo cuestionado en un estudio posterior del mismo grupo (Puig-Pey et al. Transplant Int 2010). Además, ninguno de estos análisis ofrece la precisión requerida para una aplicación clínica generalizada. El uso de técnicas que obtienen el perfil de expresión génica para identificar biomarcadores de tolerancia se ha empleado tanto en trasplantes de riñón como de hígado (S. Brouard et al. PNAS 2007; M. Martínez-Llordella et al. J Clin Invest 2008; K.Newell et al. J Clin Invest 2010; P. Sagoo et al. J Clin Invest 2010). Estas técnicas son más fáciles de estandarizar que las pruebas descritas anteriormente. Además, los estudios referenciados han mostrado que el uso de los biomarcadores transcripcionales identificados es un medio extremadamente preciso para diferenciar entre receptores tolerantes sin fármacos inmunosupresores y receptores no tolerantes que requieren el mantenimiento de la inmunosupresión. La principal limitación de los estudios publicados en la literatura hasta el momento es que no han intentado validar prospectivamente sus resultados. En otras palabras, no han sido capaces de demostrar si estos marcadores pueden identificar receptores tolerantes antes de que se interrumpa la inmunosupresión. Ante la ausencia de esta demostración no es posible estar seguros de que las diferencias observadas en la expresión génica no están causadas realmente por el efecto de la inmunosupresión farmacológica en el grupo de los receptores no tolerantes. Además, ninguno de los estudios comentados anteriormente ha intentado investigar si las diferencias en la expresión génica también existen a nivel del injerto en sí.

Mientras que el uso crónico de fármacos inmunosupresores es actualmente el único medio para asegurar la supervivencia a largo plazo de los aloinjertos trasplantados, estos fármacos son caros y están asociados a graves efectos secundarios (nefrotoxicidad, tumores y desarrollo de infecciones, diabetes, complicaciones cardiovasculares, etc.) que conducen a una morbilidad y mortalidad sustanciales. Por lo tanto, cualquier estrategia capaz de reducir significativamente el uso de fármacos inmunosupresores en el trasplante puede tener un gran impacto en la salud y la calidad de vida de los receptores trasplantados.

En conclusión, sigue siendo un reto la provisión de un método validado capaz de predecir la tolerancia en los pacientes trasplantados de hígado, y por lo tanto, capaz de indicar si puede prescindirse de la administración de fármacos inmunosupresores a dichos pacientes.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Por lo tanto, la presente invención está dirigida a solucionar el problema citado anteriormente por medio de la identificación de perfiles de expresión génica como biomarcadores, capaces de predecir la tolerancia en pacientes trasplantados de hígado. Por lo tanto, con el objetivo de identificar aquellos genes que muestran una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión entre los receptores de hígado que pueden interrumpir el tratamiento inmunosupresor (tolerantes) y aquellos que requieren el mantenimiento de los fármacos inmunosupresores (no tolerantes), se tomaron muestras de biopsias de tejido hepático a partir de un grupo de receptores de trasplante hepático estables bajo el mantenimiento del tratamiento inmunosupresor quienes se reclutaron en un estudio clínico prospectivo de retirada de los fármacos inmunosupresores.

El perfil de expresión puede determinarse mediante cualquier tecnología conocida por un experto medio en la materia. En concreto, cada nivel de expresión génica puede medirse a nivel genómico y/o nucleico y/o proteico. En un aspecto preferido, el perfil de expresión se determina midiendo la cantidad de transcritos de ácido nucleico de cada gen. En otro aspecto, el perfil de expresión se determina midiendo la cantidad de proteína producida por cada uno de los genes.

La cantidad de transcritos de ácido nucleico puede medirse mediante cualquier tecnología conocida por un experto medio en la materia. En concreto, la medición puede llevarse a cabo directamente sobre una muestra de la que se extrae el ARN mensajero (ARNm), o sobre un ADN complementario (ADNc) retrotranscrito a partir de ARNm extraído mediante tecnologías bien conocidas en el estado de la técnica. A partir de la muestra de ARNm o ADNc, la cantidad de transcritos de ácido nucleico puede medirse utilizando cualquier tecnología conocida por un experto medio en la materia, incluyendo microarrays nucleicos, PCR cuantitativa e hibridación con una sonda marcada.

En un aspecto concreto, que no debe considerarse como limitante del campo de la invención, la determinación del perfil de expresión de estas biopsias se llevó a cabo primero con el microarray de expresión de todo el genoma Illumina Beadchip, que identificó genes con un p-valor<0.01 y una tasa de falso descubrimiento (FDR) <25% (Tabla 1).

ES 2 400 490 T3

Tabla 1. Lista de genes expresados diferencialmente entre muestras de biopsia hepática de tolerantes y no tolerantes.

Gen	Secuencia referencia NCBI (RefSeq)	FDR	p-valor
<i>TFRC</i>	No Annotation	0	1,19E-005
<i>LOC644037</i>	XR_017337	0	2,13E-005
<i>LOC729266</i>	XM_001721977	10,01418211	4,50E-006
<i>ST7OT1</i>	NR_002330	10,01418211	9,12E-006
<i>MYO19</i>	NM_001033580	10,01418211	1,16E-005
<i>TP53I3</i>	NM_004881	10,01418211	0,000143629
<i>HAMP</i>	NM_021175	10,01418211	0,001152774
<i>MCOLN1</i>	NM_020533	15,02127316	3,52E-005
<i>OTUD7A</i>	NM_130901	15,02127316	4,21E-005
<i>EXT2</i>	NM_000401	15,02127316	7,92E-005
<i>KLHL28</i>	NM_017658	15,02127316	0,000219206
<i>UHMK1</i>	NM_175866	15,02127316	0,000252044
<i>FIGF</i>	NM_004469	15,02127316	0,000482129
<i>SLC1A7</i>	NM_006671	15,02127316	0,000917616
<i>ADORA3</i>	NM_020683	15,02127316	0,001104349
<i>SLC5A12</i>	NM_178498	15,02127316	0,001594655
<i>TAF15</i>	NM_139215	15,02127316	0,001995782
<i>TPPP3</i>	NM_016140	16,89893231	2,00E-005
<i>TAGLN</i>	NM_001001522	16,89893231	2,71E-005
<i>NFKBIL2</i>	NM_013432	16,89893231	3,36E-005
<i>OR2C3</i>	NM_198074	16,89893231	0,000221256
<i>UNG</i>	NM_080911	16,89893231	0,000297046
<i>GHSR</i>	NM_004122	16,89893231	0,000320149
<i>KRTAP5-10</i>	NM_001012710	16,89893231	0,000411491
<i>UNC13A</i>	NM_001080421	16,89893231	0,000434094
<i>G3BP1</i>	NM_198395	23,05590765	0,000139785
<i>ANKRD5</i>	NM_022096	23,05590765	0,000181261
<i>RBM23</i>	NM_018107	23,05590765	0,000181688
<i>RAG2</i>	NM_000536	23,05590765	0,000191286
<i>TUBA8</i>	NM_018943	23,05590765	0,000201266
<i>DGKK</i>	NM_001013742	23,05590765	0,000210462
<i>C1orf61</i>	NM_006365	23,05590765	0,000286859
<i>ADSSL1</i>	NM_199165	23,05590765	0,0004024
<i>FBXL4</i>	NM_012160	23,05590765	0,000406323
<i>VAC14</i>	NM_018052	23,05590765	0,000426174
<i>LOC643668</i>	XR_039201	23,05590765	0,000427565
<i>RNASE13</i>	NM_001012264	23,05590765	0,000451496
<i>SAGE1</i>	NM_018666	23,05590765	0,000474797
<i>RTP2</i>	NM_001004312	23,05590765	0,000516765
<i>SYNE2</i>	NM_182910	23,05590765	0,00052836
<i>TSPAN2</i>	NM_005725	23,05590765	0,000583719
<i>SCRG1</i>	NM_007281	23,05590765	0,000676665
<i>ACSL1</i>	NM_001995	23,05590765	0,000734359
<i>STRN4</i>	NM_013403	23,05590765	0,000767142
<i>TUBA4A</i>	NM_006000	23,05590765	0,000924509
<i>RIBC1</i>	NM_144968	23,05590765	0,000965443
<i>MCHR1</i>	NM_005297	23,05590765	0,00099149
<i>MUTED</i>	NM_201280	23,05590765	0,001028448
<i>TANK</i>	NM_004180	23,05590765	0,001031594
<i>DPP4</i>	NM_001935	23,05590765	0,001174649
<i>CHD3</i>	NM_001005271	23,05590765	0,00129579
<i>KLK15</i>	NM_017509	23,05590765	0,00133

Gen	Secuencia referencia NCBI (RefSeq)	FDR	p-valor
<i>NFIX</i>	NM_002501	23,05590765	0,001358456
<i>FAM3B</i>	NM_206964	23,05590765	0,001386029
<i>DOC2A</i>	NM_003586	23,05590765	0,001388434
<i>NQO2</i>	NM_000904	23,05590765	0,001470921
<i>KIAA1143</i>	NM_020696	23,05590765	0,001478818
<i>PLCD3</i>	NM_133373	23,05590765	0,001551069
<i>PLXNA4</i>	NM_181775	23,05590765	0,001589304
<i>ADAMTS3</i>	NM_014243	23,05590765	0,001589498
<i>ABAT</i>	NM_001127448	23,05590765	0,001742645
<i>POF1B</i>	NM_024921	23,05590765	0,001746171
<i>CYP2W1</i>	NM_017781	23,05590765	0,001815383
<i>HSPA1A</i>	NM_005345	23,05590765	0,002150872
<i>FAM162A</i>	NM_014367	23,05590765	0,002262613
<i>KIAA1274</i>	NM_014431	23,05590765	0,002458413
<i>CP</i>	NM_000096	23,05590765	0,002664451
<i>OR5A2</i>	NM_001001954	23,05590765	0,002806537
<i>C9orf127</i>	NM_001042589	23,05590765	0,003069775
<i>AMPD2</i>	NM_203404	23,05590765	0,004156098
<i>KRT19</i>	NM_002276	23,05590765	0,006219448
<i>ATP1B1</i>	NM_001677	23,05590765	0,006336133
<i>C20orf71</i>	NM_178466	24,92892142	0,001022188
<i>LTBP4</i>	NM_001042544	24,92892142	0,00131758
<i>CNTNAP1</i>	NM_003632	24,92892142	0,002377442
<i>FNDC3A</i>	NM_014923	24,92892142	0,002414448
<i>ZNF665</i>	NM_024733	24,92892142	0,00332211

Sobre la base de los resultados del microarray y varios estudios dirigidos en modelos experimentales animales de tolerancia inmunológica, se seleccionó un grupo de 104 genes (enumerados en la **Tabla 2**) para su validación empleando la PCR cuantitativa en tiempo real.

5

Tabla 2. Lista de genes analizados mediante PCR en tiempo real

Gen	ID Gen NCBI	Nombre	Criterio de Selección
<i>18S</i>	100008588	ARNr Eucariótico 18S	HK
<i>TP53/3</i>	9540	proteína inducible 3 de la proteína p53 del tumor	M
<i>HAMP</i>	57817	hepcidina, péptido antimicrobiano	M
<i>SAGE1</i>	55511	antígeno 1 del sarcoma	M
<i>DPP4</i>	1803	dipeptidil-peptidasa 4	M
<i>MYO19</i>	80179	miosina XIX	M
<i>MCOLN1</i>	57192	mucolipina 1	M
<i>ACSL1</i>	2180	miembro 1 de la familia acil-CoA sintetasa de cadena larga	M
<i>UNG</i>	7374	uracil-ADN glicosilasa	M
<i>TFRC</i>	7037	receptor de la transferrina (p90, CD71)	M
<i>TUBA4A</i>	7277	tubulina, alfa 4a	M
<i>COG5</i>	10466	componente 5 del complejo oligomérico de golgi	M
<i>FAM162A</i>	26355	familia con secuencia 162 similar, miembro A	PK
<i>FKBP1A</i>	2280	proteína 1A de unión a FK506, 12kDa	PK
<i>ABAT</i>	18	4-aminobutirato aminotransferasa	M
<i>CP</i>	1356	ceruloplasmina (ferroxidasa)	PK
<i>HLA-E</i>	3133	complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, E	PK
<i>CXCR7</i>	57007	receptor 7 de la quimiocina (motivo C-X-C)	PK
<i>SRGN</i>	5552	serglicina	PK
<i>PRF1</i>	5551	perforina 1 (proteína formadora de poros)	PK
<i>TLR8</i>	51311	receptor tipo toll 8	PK
<i>STAT1</i>	6772	transductor de señales y activador de la transcripción 1	PK
<i>IL18BP</i>	10068	proteína de unión a interleucina 18	PK
<i>PSMB9</i>	5698	proteasoma (prosoma, macropain) subunidad 9	PK

ES 2 400 490 T3

Gen	ID Gen NCBI	Nombre	Criterio de Selección
<i>HFE</i>	3077	hemocromatosis	PK
<i>IRF1</i>	3659	factor 1 regulador del interferón	PK
<i>CXCL9</i>	4283	ligando 9 de la quimiocina (motivo C-X-C)	PK
<i>UBD</i>	10537	ubiquitina D	PK
<i>CD8A</i>	925	molécula CD8a	PK
<i>IL32</i>	9235	interleucina 32	PK
<i>CXCL10</i>	3627	ligando 10 de la quimiocina (motivo C-X-C)	PK
<i>CCL3</i>	6348	ligando 3 de la quimiocina (motivo C-C)	PK
<i>CD3D</i>	915	molécula CD3d, delta (complejo CD3-TCR)	PK
<i>IL6</i>	3569	interleucina 6 (interferón, beta 2)	PK
<i>IL1A</i>	3552	interleucina 1, alfa	PK
<i>IL1B</i>	3553	interleucina 1, beta	PK
<i>TFR2</i>	7036	receptor 2 de la transferrina	PK
<i>HFE2</i>	148738	hemocromatosis tipo 2 (juvenil)	PK
<i>BMP4</i>	652	proteína 4 morfogenética de hueso	PK
<i>SMAD4</i>	4089	miembro 4 de la familia SMAD	PK
<i>FTH1</i>	2495	ferritina, polipéptido pesado 1	PK
<i>PDCD1</i>	5133	muerte celular programada 1	PK
<i>HLA-G</i>	3135	complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, G	PK
<i>FOXP3</i>	50943	caja P3 del <i>forkhead</i>	PK
<i>IL10</i>	3586	interleucina 10	PK
<i>TGFB1</i>	7040	factor de crecimiento transformador, beta 1	PK
<i>IL2RB</i>	3560	receptor interleucina 2, beta	PK
<i>KLRF1</i>	51348	receptor tipo lectina en células killer, subfamilia F, 1	PK
<i>SLAMF7</i>	57823	miembro 7 de la familia SLAM	PK
<i>KLRD1</i>	3824	receptor tipo lectina en células killer, subfamilia D, 1	PK
<i>CX3CR1</i>	1524	receptor 1 de la quimiocina (motivo C-X3-C)	PK
<i>LINGO2</i>	158038	repeticiones ricas en leucina conteniendo 2 dominios Ig	PK
<i>BNC2</i>	54796	basonuclina 2	PK
<i>NCR1</i>	9437	receptor desencadenante de citotoxicidad natural 1	PK
<i>COL13A1</i>	1305	colágeno, tipo XIII, alfa 1	PK
<i>IGFBP7</i>	3490	proteína 7 de unión al factor de crecimiento tipo insulina	PK
<i>SH2D1B</i>	117157	dominio SH2 que contiene 1B	PK
<i>NCAM1</i>	4684	molécula 1 de adhesión a la célula neuronal	PK
<i>KLRK1</i>	22914	receptor tipo lectina en células killer, subfamilia K, 1	PK
<i>KLRC1</i>	3821	receptor tipo lectina en células killer, subfamilia C, 1	PK
<i>MICA</i>	4276	secuencia polipéptido-relacionada A de la clase I de MHC	PK
<i>MICB</i>	4277	secuencia polipéptido-relacionada B de la clase I de MHC	PK
<i>TLR4</i>	7099	receptor tipo toll 4	PK
<i>GZMB</i>	3002	granzima B (granzima 2)	PK
<i>AP1S2</i>	8905	complejo adaptador proteico 1, sigma 2	PK
<i>SMARCD3</i>	6604	relacionado con SWI/SNF, asociado a la matriz	PK
<i>CD37</i>	951	molécula CD37	PK
<i>FCER2</i>	2208	fragmento relacionado de IgE, afinidad baja II, receptor de Fc (CD23)	PK
<i>MS4A1</i>	931	4 dominios que atraviesan la membrana	PK
<i>CXCR3</i>	2833	receptor 3 de la quimiocina (motivo C-X-C)	PK
<i>CXCL11</i>	6373	ligando 11 de la quimiocina (motivo C-X-C)	PK
<i>IFNG</i>	3458	interferón, gamma	PK
<i>CD274</i>	29126	molécula CD274	PK
<i>PDCD1LG2</i>	80380	muerte celular programada 1, ligando 2	PK
<i>C3</i>	718	componente 3 del complemento	PK
<i>TBX21</i>	30009	caja T 21	PK
<i>GATA3</i>	2625	proteína 3 de unión a GATA	PK
<i>FAS</i>	355	Fas (superfamilia receptor TNF, miembro 6)	PK
<i>FASLG</i>	356	ligando Fas (superfamilia receptor TNF, miembro 6)	PK
<i>RORC</i>	6097	receptor C huérfano asociado a RAR	PK
<i>HMOX1</i>	3162	hemo-oxigenasa (deciclizadora) 1	PK
<i>TNFAIP3</i>	7128	factor de necrosis tumoral, proteína alfa-inducida 3	PK
<i>BCL2</i>	596	linfoma 2/LLC de célula B	PK
<i>SOCS1</i>	8651	supresor de la señalización de citoquinas 1	PK
<i>TNF</i>	7124	factor de necrosis tumoral (superfamilia TNF, 2)	PK

Gen	ID Gen NCBI	Nombre	Criterio de Selección
<i>NOS2</i>	4843	óxido nítrico sintasa 2, inducible	PK
<i>IL12B</i>	3593	interleucina 12B (estimulador de las células natural killer 2)	PK
<i>IL18</i>	3606	interleucina 18 (factor inductor de interferón-gamma)	PK
<i>IRF3</i>	3661	factor regulador de interferón 3	PK
<i>CCL21</i>	6366	ligando 21 de la quimiocina (motivo C-C)	PK
<i>HPRT1</i>	3251	hipoxantina-fosforribosiltransferasa 1	HK
<i>GAPDH</i>	2597	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	HK
<i>DTWD2</i>	285605	dominio DTW conteniendo 2	M
<i>POF1B</i>	79983	fallo ovárico prematuro, 1B	M
<i>MYD88</i>	4615	respuesta primaria de diferenciación mieloide dependiente del gen (88)	PK
<i>DAB2</i>	1601	discapitado homólogo 2	M
<i>TIPARP</i>	25976	poli(ADP-ribosa) polimerasa inducible por TCDD	M
<i>RBM23</i>	55147	motivo 23 de la proteína de unión a ARN	M
<i>TTC3</i>	7267	dominio repetido 3 del tetratricopéptido	M
<i>MIF</i>	4282	factor inhibidor de la migración de macrófagos	M
<i>PEBP1</i>	5037	proteína 1 de unión a la fosfatidiletanolamina	M
<i>SLC5A12</i>	159963	familia 5 miembro 12 del transportador de solutos	M
<i>FABP4</i>	2167	proteína 4 de unión a ácido graso	M
<i>PCDH24</i>	54825	protocadherina 24	M
<i>VNN3</i>	55350	vanina 3	M
<i>ADORA3</i>	140	receptor A3 de adenosina	M
<i>TAF15</i>	8148	Factor asociado a la proteína de unión a la caja TATA (TBP)	M

(M=significativo en microarray, PK=conocido previamente, HK= control constitutivo)

Fecha de acceso NCBI: 28 de julio 2010

5 Los resultados de los experimentos llevados a cabo por PCR en tiempo real revelaron que los genes enumerados en la **Tabla 3** muestran una diferencia significativa en la expresión entre biopsias tomadas de pacientes trasplantados de hígado que pueden abandonar de forma segura los fármacos inmunosupresores (tolerantes) y los pacientes que sufren rechazo cuando se interrumpen los fármacos inmunosupresores (no tolerantes). Como se muestra en la **Tabla 3**, los genes *TFRC* y *MIF* están sobre-regulados, y los genes *CDHR2*, *HMOX1*, *HAMP*, *IFNG*, *PEBP1*, *SLC5A12*, *ADORA3* y *DAB2* están infra-regulados, en receptores de trasplante hepático tolerantes comparados con una muestra de ARN de referencia (que puede ser un conjunto de ARNs obtenidos de tejido hepático no trasplantado sano, un ARN de referencia como el disponible comercialmente *Human Liver Total RNA* de Ambion, o una referencia absoluta que consiste en una muestra que contiene un número previamente cuantificado de moléculas de ARN)

Tabla 3

Gen	p-valor		Ratio de cambio de expresión
	t de Student	Wilcox	
<i>TFRC</i>	0,000035	0,000026	-2,505329
<i>CDHR2</i>	0,006059	0,004665	1,747146
<i>HMOX1</i>	0,007195	0,005044	1,399586
<i>MIF</i>	0,008793	0,003526	-1,547565
<i>HAMP</i>	0,012583	0,077430	2,173470
<i>IFNG</i>	0,013215	0,020816	1,319508
<i>PEBP1</i>	0,023371	0,011855	1,132884
<i>SLC5A12</i>	0,032834	0,022216	2,345670
<i>ADORA3</i>	0,039721	0,041890	1,464086
<i>DAB2</i>	0,046314	0,049169	1,193336

15

Es importante destacar que los genes comprendidos en la **Tabla 3** comparten una ruta de señalización funcional porque la mayoría de ellos están implicados en la regulación del metabolismo del hierro. De hecho, las biopsias de los pacientes que pueden interrumpir con éxito la medicación inmunosupresora mostraron una mayor acumulación de hierro, como se muestra en la **Figura 1**. Se sabe que los genes *TFRC*, *HAMP*, *IFNG* y *HMOX1* están directamente implicados en el control del metabolismo celular del hierro. Además, la expresión de muchos de los genes expresados diferencialmente entre pacientes en los que es posible eliminar la medicación inmunosupresora (tolerantes) y aquellos en los que dicha eliminación no es recomendable (no tolerantes), como *CDHR2*, *MIF*, *SLC5A12*, *ADORA3* y *DAB2*, se correlaciona significativamente con el depósito de hierro intrahepático (medido mediante el método modificado de Scheuer o el método "resultado total de hierro"; ver **Figura 2**). Una prueba adicional que enfatiza el papel del

20

25

metabolismo del hierro en la adquisición de la tolerancia operacional en los aloinjertos de hígado es la observación de que los niveles séricos de hepcidina (la hormona más importante en la regulación de la homeostasis del hierro sistémico, codificada por *HAMP*) son significativamente mayores en receptores de hígado tolerantes que en los no tolerantes (ver **Figura 3**). Tomados en conjunto, estos resultados indican que la regulación del metabolismo del hierro a nivel intrahepático juega un papel en el control de las respuestas alo-inmunes en el trasplante de hígado.

Más específicamente, estos resultados indican que el nivel de expresión de los genes involucrados en dicha regulación del metabolismo del hierro debería ser particularmente relevante para el diseño de un método de acuerdo con la presente divulgación.

Así, el primer aspecto de la presente invención hace referencia a un método para el diagnóstico o pronóstico *in vitro* del estado de tolerancia de un paciente sometido a un trasplante hepático que comprende:

- a. Medición, en una muestra biológica obtenida del aloinjerto hepático del paciente bajo investigación, de los niveles de expresión de al menos uno de los siguientes genes o combinación o equivalente de los mismos: *TFRC*, *CDHR2*, *HMOX1*, *MIF*, *HAMP*, *IFNG*, *PEBP1*, *SLC5A12*, *ADORA3* y *DAB2*;
- b. Evaluación de la tolerancia o no tolerancia del paciente bajo investigación al trasplante de hígado mediante la comparación del nivel de expresión de al menos uno de los genes del paso a), o combinación de los mismos, con el nivel de expresión de los mismos genes tomado a partir de una muestra de referencia.

La muestra de referencia es un perfil de expresión predeterminado, obtenido a partir de una muestra biológica de un sujeto obtenida de un tejido hepático no trasplantado sano. Puede ser un conjunto de ARNs, un ARN de referencia como el disponible comercialmente *Human Liver Total RNA* de Ambion, o una referencia absoluta que consiste en una muestra que contiene un número previamente cuantificado de moléculas de ARN.

Como se muestra en la **Tabla 4** más abajo, la medición del nivel de expresión de cada uno de los genes comprendidos en la **Tabla 3** es útil para la identificación de pacientes que puedan interrumpir de forma segura la medicación inmunosupresora sin sufrir rechazo (tolerancia). Por lo tanto, esta **Tabla 4** muestra la capacidad de los genes individuales ahí enumerados para diferenciar estadísticamente los pacientes que tolerarán el hígado trasplantado en ausencia de tratamiento inmunosupresor, de aquellos receptores que lo rechazarán cuando se interrumpa la medicación inmunosupresora.

Tabla 4

GENES	AUC	SN	SP	ER	PPV	NPV
<i>TFRC</i>	0,76	51,72	90,48	25,35	78,95	73,08
<i>CDHR2</i>	0,70	58,62	83,33	26,76	70,83	74,47
<i>HMOX1</i>	0,70	55,17	83,33	28,17	69,57	72,92
<i>PEBP1</i>	0,68	44,83	90,48	28,17	76,47	70,37
<i>MIF</i>	0,68	93,1	52,38	30,99	57,45	91,67
<i>SLC5A12</i>	0,66	44,83	85,71	30,99	68,42	69,23
<i>DAB2</i>	0,65	58,62	73,81	32,39	60,71	72,09
<i>IFNG</i>	0,64	31,03	90,48	33,8	69,23	65,52
<i>HAMP</i>	0,63	86,21	52,38	33,8	55,56	84,62
<i>ADORA3</i>	0,65	20,69	95,24	35,21	75	63,49

AUC: área bajo la curva

SN: sensibilidad

SP: especificidad

ER: tasa de error

PPV: valor predictivo positivo

NPV: valor predictivo negativo

Sin embargo, aunque los genes citados en las **Tablas 3** ó **4** tienen una capacidad predictiva individual, se han hecho diferentes grupos partiendo de algunas combinaciones de dichos genes, con el objetivo de identificar un método predictivo lo más preciso posible. Además, los genes enumerados en las **Tablas 3** ó **4** se agruparon también con otros genes que no mostraron un valor predictivo *per se* (tomados independientemente), por ejemplo: *LC5A12*, *VNN3*, *SOCS1*, *TTC3*, *RBM23*, *SH2D1B*, *NCR1*, *TFRC*, *TUBA4A*, *TAF15*, *TIPARP*, *MOX1*, *MCOLN1*, *EBP1*, *DHR2*, y *AB2*. Por lo tanto, en un aspecto preferido, la presente invención comprende además la medición de los niveles de expresión de al menos uno de los siguientes genes: *LC5A12*, *VNN3*, *SOCS1*, *TTC3*, *RBM23*, *SH2D1B*, *NCR1*, *TFRC*, *TUBA4A*, *TAF15*, *TIPARP*, *MOX1*, *MCOLN1*, *EBP1*, *DHR2*, y *AB2* en combinación con al menos uno de los genes enumerados en la **Tabla 3** ó **4**.

Para identificar la/s combinación/es de biomarcadores de la expresión génica con el mejor perfil en el diagnóstico del resultado de la retirada de los fármacos inmunosupresores en el trasplante de hígado, llevamos a cabo una búsqueda exhaustiva de modelos predictivos empleando el análisis discriminante lineal y algoritmos de regresión logística implementados en el software de penalización posterior de la clasificación errónea (*misclassification penalized posterior*, MiPP). En primer lugar, llevamos a cabo un paso de validación cruzada con 10 subconjuntos en un grupo de muestras hepáticas (18 tolerantes y 31 no tolerantes) recogidas de pacientes reclutados en el Hospital Clínic de Barcelona. A continuación, se llevó a cabo una validación cruzada con divisiones aleatorias de los modelos diagnósticos sobre el conjunto completo de datos (que incluía las 56 muestras de Barcelona y 21 muestras adicionales de Roma y Lovaina) dividiéndolo repetidamente en grupos de entrenamiento (2/3) y en grupos de evaluación independiente (1/3) para la validación del modelo externo. Además, para cada modelo identificado en el grupo de entrenamiento el valor de corte para la probabilidad óptima de tolerancia se calculó empleando el análisis ROC (Característica Operativa del Receptor). Para demostrar que la interpretación de los modelos no era centro-dependiente, calculamos entonces SN, SP, NPV, PPV y las tasas de error globales para las muestras recogidas de Barcelona y para aquellas obtenidas de Roma y Lovaina. Es importante destacar que todas las mediciones de la expresión génica se llevaron a cabo sobre muestras obtenidas antes de que se interrumpiera la medicación inmunosupresora. Nuestros resultados por lo tanto indican que los marcadores genéticos identificados son capaces de predecir el éxito de la retirada de los fármacos inmunosupresores.

Como se comentó anteriormente, este tipo de análisis tiene en cuenta no sólo aquellos genes que se encontró que se expresaban de forma diferenciada (**Tabla 3**) sino también los genes que, aunque no se expresan de forma significativamente diferente, sí se analizan de forma individual, sí que contribuyen a optimizar el diagnóstico en combinación con los genes de la **Tabla 3**. La **Tabla 5** muestra los grupos de muestras empleados para el diseño y evaluación de los modelos predictivos basados en la expresión de biopsias hepáticas de los genes medidos mediante PCR en tiempo real. Es importante destacar que, mientras que las muestras recogidas en los receptores de Barcelona se emplearon tanto para los experimentos con microarray y qPCR, ninguna de las muestras obtenidas de Roma y Lovaina se emplearon en los experimentos con microarray.

Tabla 5

	TOL (n)	No-TOL (n)	origen
Grupo de entrenamiento	18	31	Barcelona
Grupo de análisis	10	11	Roma/Lovaina

Así, la **Tabla 6** muestra las combinaciones de genes cuya expresión mejor clasifica a los pacientes en las categorías de tolerantes y no tolerantes de acuerdo con los resultados de las mediciones de expresión por PCRq. Se seleccionó arbitrariamente un error de clasificación menor del 15% en el grupo de aprendizaje y menor del 10% en el grupo de validación para seleccionar los modelos más precisos y clínicamente útiles.

Tabla 6

Genes	n	Barcelona			Roma + Lovaina		
		SN	SP	ER	SN	SP	ER
SLC5A12+VNN3+TFRC+SOCS1+MIF+TTC3+RBM23+PEBP1+SH2D1B+NCR1+DAB2+ADORA3	12	100	90,32	6,12	90	90,91	9,52
TFRC+PEBP1+MIF+CDHR2+HAMP+TUBA4A+TTC3+HMOX1+VNN3+NCR1+ADORA3+TAF15+IFNG+SOCS1+TIPARP	15	94,44	93,55	6,12	80	100	9,52
HMOX1+CDHR2+MIF+PEBP1+TFRC+SLC5A12+SOCS1+HAMP+VNN3+IFNG	10	94,44	90,32	8,16	80	100	9,52
TFRC+PEBP1+MIF+CDHR2+SLC5A12+HAMP+SOCS1+IFNG+HMOX1	9	94,44	90,32	8,16	80	100	9,52
TFRC+IFNG+CDHR2+ADORA3+HAMP+MIF+PEBP1+VNN3+SOCS1+HMOX1+DAB2	11	88,89	90,32	10,2	80	100	9,52
TFRC+DAB2+MIF+PEBP1+IFNG+HAMP+SLC5A12+SOCS1+VNN3+ADORA3+CDHR2+MCOLN1+HMOX1	13	77,78	96,77	10,2	80	100	9,52
TFRC+IFNG+HMOX1+MCOLN1+MIF+HAMP+ADORA3+CDHR2+PEBP1+SOCS1	10	88,89	90,32	10,2	80	100	9,52
PEBP1+TFRC+HMOX1+IFNG+MCOLN1+SOCS1+MIF+CDHR2+HAMP+ADORA3	10	88,89	90,32	10,2	80	100	9,52
TFRC+PEBP1+IFNG+CDHR2+ADORA3+VNN3+HMOX1+DAB2+SOCS1+MIF+HAMP	11	88,89	90,32	10,2	80	100	9,52
CDHR2+ADORA3+IFNG+TFRC+VNN3+HMOX1+PEBP1+MIF+SLC5A12+HAMP+SOCS1+MCOLN1	12	77,78	96,77	10,2	80	100	9,52
SLC5A12+TFRC+IFNG+MIF+DAB2+HMOX1+CDHR2+SOCS1+HAMP+PEBP1+VNN3+ADORA3+MCOLN1	13	77,78	96,77	10,2	80	100	9,52
TFRC+SOCS1+HMOX1+PEBP1+VNN3+CDHR2+HAMP+IFNG+DAB2+MCOLN1+ADORA3+MIF	12	83,33	93,55	10,2	80	100	9,52
TFRC+PEBP1+VNN3+SOCS1+MIF+HMOX1+DAB2+HAMP+IFNG+CDHR2+ADORA3+MCOLN1	12	83,33	93,55	10,2	80	100	9,52
SLC5A12+MIF+CDHR2+TFRC+IFNG+ADORA3+HAMP+VNN3+SOCS1+MCOLN1+PEBP1+HMOX1	12	77,78	96,77	10,2	80	100	9,52
TFRC+IFNG+CDHR2+ADORA3+PEBP1+VNN3+MIF+HMOX1+MCOLN1+SOCS1+SLC5A12+DAB2,+HAMP	13	77,78	96,77	10,2	80	100	9,52
TFRC+VNN3+HAMP+CDHR2+SLC5A12+HMOX1+SOCS1+PEBP1+MIF	9	94,44	83,87	12,24	80	100	9,52
DAB2+TFRC+MIF+CDHR2+PEBP1+VNN3+TTC3+HMOX1+SOCS1	9	83,33	90,32	12,24	80	100	9,52
TFRC+PEBP1+MIF+CDHR2+VNN3+IFNG+MCOLN1+SOCS1	8	88,89	83,87	14,29	80	100	9,52
TFRC+PEBP1+MIF+SOCS1+CDHR2	5	94,44	80,65	14,29	80	100	9,52

SN: sensibilidad

SP: especificidad

5 ER: tasa de error

PPV: valor predictivo positivo

NPV: valor predictivo negativo

10 Un aspecto de la presente invención hace referencia al uso de al menos uno de los siguientes genes o combinaciones de los mismos: *TFRC*, *CDHR2*, *HMOX1*, *MIF*, *HAMP*, *IFNG*, *PEBP1*, *SLC5A12*, *ADORA3* y *DAB2*, en un método para el diagnóstico *in vitro* o el pronóstico del estado de tolerancia de un paciente sometido a una trasplante de hígado. En un aspecto preferido, el método de la invención se lleva a cabo usando una combinación de al menos uno de los genes citados anteriormente con al menos uno de los siguientes genes: *LC5A12*, *VNN3*, *SOCS1*, *TTC3*, *RBM23*, *SH2D1B*, *NCR1*, *TFRC*, *TUBA4A*, *TAF15*, *TIPARP*, *MOX1*, *MCOLN1*, *EBP1*, *DHR2*, y *AB2*. En un aspecto particularmente

15 preferido, el método de la invención se lleva a cabo usando una de las siguientes combinaciones de genes: *LC5A12*, *VNN3*, *TFRC*, *SOCS1*, *MIF*, *TTC3*, *RBM23*, *PEBP1*, *SH2D1B*, *NCR1*, *DAB2* y *ADORA3*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *HAMP*, *TUBA4A*, *TTC3*, *HMOX1*, *VNN3*, *NCR1*, *ADORA3*, *TAF15*, *IFNG*, *SOCS1* y *TIPARP*; *MOX1*, *CDHR2*, *MIF*, *PEBP1*, *TFRC*, *SLC5A12*, *SOCS1*, *HAMP*, *VNN3* y *IFNG*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *SLC5A12*, *HAMP*, *SOCS1*, *IFNG* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *HAMP*, *MIF*, *PEBP1*, *VNN3*, *SOCS1*, *HMOX1* y *DAB2*; *TFRC*, *DAB2*, *MIF*, *PEBP1*, *IFNG*, *HAMP*, *SLC5A12*, *SOCS1*, *VNN3*, *ADORA3*, *CDHR2*, *MCOLN1* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *HMOX1*, *MCOLN1*, *MIF*, *HAMP*, *ADORA3*, *CDHR2*, *PEBP1* y *SOCS1*; *EBP1*, *TFRC*, *HMOX1*, *IFNG*, *MCOLN1*, *SOCS1*, *MIF*,

20

CDHR2, HAMP y ADORA3; TFRC, PEBP1, IFNG, CDHR2, ADORA3, VNN3, HMOX1, DAB2, SOCS1, MIF y HAMP; DHR2, ADORA3, IFNG, TFRC, VNN3, HMOX1, PEBP1, MIF, SLC5A12, HAMP, SOCS1 y MCOLN1; LC5A12, TFRC, IFNG, MIF, DAB2, HMOX1, CDHR2, SOCS1, HAMP, PEBP1, VNN3, ADORA3 y MCOLN1; TFRC, SOCS1, HMOX1, PEBP1, VNN3, CDHR2, HAMP, IFNG, DAB2, MCOLN1, ADORA3 y MIF; TFRC, PEBP1, VNN3, SOCS1, MIF, HMOX1, DAB2, HAMP, IFNG, CDHR2, ADORA3 y MCOLN1; LC5A12, MIF, CDHR2, TFRC, IFNG, ADORA3, HAMP, VNN3, SOCS1, MCOLN1, PEBP1 y HMOX1; TFRC, IFNG, CDHR2, ADORA3, PEBP1, VNN3, MIF, HMOX1, MCOLN1, SOCS1, SLC5A12, DAB2 y HAMP; TFRC, VNN3, HAMP, CDHR2, SLC5A12, HMOX1, SOCS1, PEBP1 y MIF; AB2, TFRC, MIF, CDHR2, PEBP1, VNN3, TTC3, HMOX1 y SOCS1; TFRC, PEBP1, MIF, CDHR2, VNN3, IFNG, MCOLN1 y SOC S1; TFRC, PEBP1, MIF, SOCS1 y CDHR2.

Algunas variables clínicas pueden influir en el desarrollo de la tolerancia operacional tras un trasplante hepático en humanos. En concreto, los receptores que fueron trasplantados tras un largo periodo de tiempo o aquellos que son mayores tienen una mayor probabilidad de ser capaces de interrumpir con éxito los medicamentos inmunosupresores. Llevamos a cabo análisis adicionales de regresión logística para excluir el potencial efecto de confusión de estas 2 variables clínicas sobre las mediciones de la expresión génica. Aparte de los genes descritos en las **Tablas 3 ó 4**, se encontró que los siguientes genes eran estadísticamente significativos tras excluir el efecto de la edad del receptor y el tiempo desde el trasplante (**Tabla 7**)

Tabla 7

Genes	p-valor
TFRC	0,0033
PEBP1	0,0125
HMOX1	0,0177
IFNG	0,0198
CDHR2	0,0234
DAB2	0,0572

Para desarrollar un modelo predictivo genético independiente de variables clínicas, empleamos la regresión logística y el software MiPP sobre los genes mostrados en la **Tabla 7**. Se encontró que el siguiente modelo era el mejor para predecir tanto en los grupos de pacientes de aprendizaje como en el de validación (**Tabla 8**).

Tabla 8

Genes	n	Barcelona			Roma+Lovaina		
		SN	SP	ER	SN	SP	ER
TFRC + IFNG + CDHR2	3	83.3	83.9	16.3	60	100	19

Así, un aspecto adicional de la presente invención hace referencia a un método para el diagnóstico *in vitro* o el pronóstico del estado de tolerancia de un paciente sometido a un trasplante de hígado mediante la medición de la expresión génica de la siguiente combinación de genes: *TFRC*, *IFNG* y *CDHR2*.

En un aspecto concreto de un método de acuerdo a la invención, dicho método puede comprender además la determinación de al menos un parámetro adicional útil para el diagnóstico o pronóstico. Esos "parámetros útiles para el diagnóstico" son parámetros que no pueden ser utilizados por sí solos para el diagnóstico pero se ha descrito que presentan valores significativamente diferentes entre los sujetos tolerantes y los sujetos que claramente necesitan tratamiento inmunosupresor y podrían también de esta forma utilizarse para perfeccionar y/o confirmar el diagnóstico de acuerdo con el método descrito anteriormente de acuerdo con la invención. Entre estos se podría incluir en particular la medición de los niveles séricos de proteínas codificadas por los genes implicados en la regulación del metabolismo del hierro en el hígado, como la Hefcidina.

Un aspecto adicional de la invención en un método como el descrito anteriormente y que además comprende la determinación de la edad del paciente y/o el tiempo de post-trasplante.

Otro aspecto divulgado hace referencia a un kit, para llevar a cabo el método de la invención para el diagnóstico *in vitro* o el pronóstico del estado de tolerancia de un paciente sometido a un trasplante de hígado, que comprende (i) medio para la medición de los niveles de expresión génica de los genes correspondientes, y (ii) instrucciones para correlacionar dichos niveles de expresión génica por encima o por debajo del nivel de expresión de los mismos genes tomados de la muestra de referencia de ARN.

Dichas muestras de referencia pueden ser un conjunto de ARNs obtenido a partir de un tejido hepático no trasplantado sano, un ARN de referencia como el disponible comercialmente *Human Liver Total RNA* de Ambion, o una referencia absoluta que consiste en una muestra que contiene un número previamente cuantificado de moléculas de ARN. En un aspecto preferido el medio comprende un microarray o un chip génico el cual comprende sondas de ácido nucleico,

5 dichas sondas de ácido nucleico comprenden secuencias que hibridan específicamente con los transcritos del correspondiente grupo de genes, junto con reactivos para llevar a cabo el análisis del microarray. En otro aspecto preferido de la invención el kit comprende cebadores oligonucleótidos (es decir, *HS02559818s1* para el gen *TFRC* o *Hs01125168m1* para el gen *VNN3*), para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa, dichos cebadores comprenden secuencias que hibridan específicamente con el ADN complementario derivado de los transcritos del correspondiente grupo de genes. Además, el kit de la invención puede comprender un soporte sólido donde se dispongan las sondas de ácido nucleico que comprenden las secuencias que hibridan específicamente con los transcritos del correspondiente grupo de genes.

10 En otro aspecto, el medio comprende un microarray o un chip de proteína que comprenden porciones de unión específicas como los anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos.

15 En un aspecto el kit mide la expresión de al menos uno de los siguientes genes o combinaciones de los mismos: *TFRC*, *CDHR2*, *HMOX1*, *MIF*, *HAMP*, *IFNG*, *PEBP1*, *SLC5A12*, *ADORA3* y *DAB2*, para el diagnóstico *in vitro* o el pronóstico del estado de tolerancia de un paciente sometido a un trasplante de hígado. En un aspecto preferido el kit mide la expresión génica de una combinación de al menos uno de los genes citado anteriormente con al menos uno de los siguientes genes: *LC5A12*, *VNN3*, *SOCS1*, *TTC3*, *RBM23*, *SH2D1B*, *NCR1*, *TFRC*, *TUBA4A*, *TAF15*, *TIPARP*, *MOX1*, *MCOLN1*, *EBP1*, *DHR2*, y *AB2*. En un aspecto particularmente preferido el kit mide la expresión génica de las siguientes combinaciones de genes: *LC5A12*, *VNN3*, *TFRC*, *SOCS1*, *MIF*, *TTC3*, *RBM23*, *PEBP1*, *SH2D1B*, *NCR1*, *DAB2* y *ADORA3*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *HAMP*, *TUBA4A*, *TTC3*, *HMOX1*, *VNN3*, *NCR1*, *ADORA3*, *TAF15*, *IFNG*, *SOCS1* y *TIPARP*; *MOX1*, *CDHR2*, *MIF*, *PEBP1*, *TFRC*, *SLC5A12*, *SOCS1*, *HAMP*, *VNN3* y *IFNG*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *SLC5A12*, *HAMP*, *SOCS1*, *IFNG* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *HAMP*, *MIF*, *PEBP1*, *VNN3*, *SOCS1*, *HMOX1* y *DAB2*; *TFRC*, *DAB2*, *MIF*, *PEBP1*, *IFNG*, *HAMP*, *SLC5A12*, *SOCS1*, *VNN3*, *ADORA3*, *CDHR2*, *MCOLN1* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *HMOX1*, *MCOLN1*, *MIF*, *HAMP*, *ADORA3*, *CDHR2*, *PEBP1* y *SOCS1*; *EBP1*, *TFRC*, *HMOX1*, *IFNG*, *MCOLN1*, *SOCS1*, *MIF*, *CDHR2*, *HAMP* y *ADORA3*; *TFRC*, *PEBP1*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *VNN3*, *HMOX1*, *DAB2*, *SOCS1*, *MIF* y *HAMP*; *DHR2*, *ADORA3*, *IFNG*, *TFRC*, *VNN3*, *HMOX1*, *PEBP1*, *MIF*, *SLC5A12*, *HAMP*, *SOCS1* y *MCOLN1*; *LC5A12*, *TFRC*, *IFNG*, *MIF*, *DAB2*, *HMOX1*, *CDHR2*, *SOCS1*, *HAMP*, *PEBP1*, *VNN3*, *ADORA3* y *MCOLN1*; *TFRC*, *SOCS1*, *HMOX1*, *PEBP1*, *VNN3*, *CDHR2*, *HAMP*, *IFNG*, *DAB2*, *MCOLN1*, *ADORA3* y *MIF*; *TFRC*, *PEBP1*, *VNN3*, *SOCS1*, *MIF*, *HMOX1*, *DAB2*, *HAMP*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3* y *MCOLN1*; *LC5A12*, *MIF*, *CDHR2*, *TFRC*, *IFNG*, *ADORA3*, *HAMP*, *VNN3*, *SOCS1*, *MCOLN1*, *PEBP1* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *PEBP1*, *VNN3*, *MIF*, *HMOX1*, *MCOLN1*, *SOCS1*, *SLC5A12*, *DAB2* y *HAMP*; *TFRC*, *VNN3*, *HAMP*, *CDHR2*, *SLC5A12*, *HMOX1*, *SOCS1*, *PEBP1* y *MIF*; *AB2*, *TFRC*, *MIF*, *CDHR2*, *PEBP1*, *VNN3*, *TTC3*, *HMOX1* y *SOCS1*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *VNN3*, *IFNG*, *MCOLN1* y *SOC S1*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *SOCS1* y *CDHR2*.

35 Uno de los aspectos preferidos hace referencia a un kit para el diagnóstico *in vitro* o el pronóstico del estado de tolerancia de un paciente sometido a un trasplante de hígado que mide la expresión génica de la siguiente combinación de genes: *TFRC*, *IFNG* y *CDHR2*.

40 Los kits, de acuerdo con la presente divulgación, pueden además comprender reactivos para llevar a cabo un análisis del microarray y/o soportes sólidos donde se disponen las sondas de ácido nucleico que comprenden secuencias que hibridan específicamente con los transcritos del correspondiente grupo de genes.

Otro aspecto hace referencia a un kit para seleccionar o modificar el protocolo de tratamiento inmunoterápico mediante el análisis del estado de tolerancia del receptor del hígado usando el método o kit descritos anteriormente.

45 El último aspecto hace referencia a un método para adaptar el tratamiento inmunosupresor de un paciente con injerto de hígado, comprendiendo dicho método el uso del método o los kits descritos anteriormente.

50 El estado de la técnica comprende (Benitez C et al., Abstract #517, *American Transplant Congress*, San Diego, CA, 3 Mayo - 5 Mayo, 2010) la medición en muestras de sangre periférica de la expresión de un grupo de genes (*KLRF1*, *PTGDR*, *NCALD*, *CD160*, *IL2RB*, *PTCH1*, *ERBB2*, *KLRB1*, *NKG7*, *KLRD1*, *FEZ1*, *GNPTAB*, *SLAMF7*, *CLIC3*, *CX3CR1*, *WDR67*, *MAN1A1*, *CD9*, *FLJ14213*, *FEM1C*, *CD244*, *PSMD14*, *CTBP2*, *ZNF295*, *ZNF267*, *RGS3*, *PDE4B*, *ALG8*, *GEMIN7*) diferentes de los presentados en la presente invención, como un método para identificar receptores de hígado tolerantes. Se llevó a cabo un ensayo comparativo (ver **Ejemplo 10**) para determinar si los genes que forman parte de la presente invención tienen un mayor poder discriminativo comparados con los genes previamente descritos en sangre periférica. Se concluyó que la medición de la expresión de los genes comprendidos en la presente invención en muestras de tejido hepático, parece al menos tan precisa como la medición de los genes comprendidos en el estado de la técnica en sangre periférica, con el fin de identificar los receptores de hígado que pueden abandonar con éxito la medicación inmunosupresora porque son tolerantes al trasplante.

60 Breve descripción de las figuras

Figura 1. El contenido de hierro del hígado (medido de manera semi-cuantitativa tras tinción de Perls empleando bien el método modificado de Scheuer o el método "resultado total de hierro") es mayor en los hígados de pacientes que abandonan con éxito el tratamiento inmunosupresor (TOL) que en aquellos donde esto no es posible (No-TOL).

Figura 2. Esta figura muestra que el depósito de hierro intra-hepático (medido por el método modificado de Scheuer) se correlaciona con la expresión de muchos de los genes expresados diferencialmente entre los pacientes en los que es posible interrumpir la medicación inmunosupresora (tolerante) y entre aquellos en los que no es posible (no tolerante).

5 **Figura 3.** Esta figura muestra que los niveles séricos de hepcidina (el péptido codificado con el gen *HAMP*) están incrementados en los receptores tolerantes comparados con los receptores de hígado no tolerantes.

EJEMPLOS

10 Ejemplo 1. Población de pacientes y diseño del estudio.

Se recogieron muestras de sangre y biopsias de hígado a partir de un grupo de receptores de trasplante hepático reclutados en un ensayo clínico prospectivo multicéntrico apoyado por la Comisión Europea de retirada de los fármacos inmunosupresores en el trasplante de hígado (Título: *Búsqueda de la Firma Inmunológica de la Tolerancia Operacional en el Trasplante de Hígado*; identificación en clinicaltrials.gov NCT00647283). Los criterios de inclusión fueron los siguientes: 1) >3 años tras el trasplante; 2) función hepática estable y sin episodios de rechazo durante los 12 meses previos a la inclusión; 3) sin historia de enfermedad hepática autoinmune; 4) biopsia hepática previa a la inclusión sin anomalías significativas (sin signos de rechazo agudo o crónico de acuerdo a los criterios de Banff; ausencia de inflamación portal en >50% del tracto portal; ausencia de perivenulitis central en >50% de las venas centrales; ausencia de fibrosis en puente o cirrosis). En los receptores reclutados se retiraron gradualmente los fármacos inmunosupresores hasta completar la retirada durante un periodo de 6-9 meses y después se siguieron durante 12 meses adicionales. Los pacientes se consideraron como tolerantes si no ocurrió ningún episodio de rechazo durante la completa duración del estudio y no se observaron cambios histológicos significativos en una biopsia obtenida al final del periodo de 12 meses de seguimiento. Los pacientes que sufrieron un rechazo agudo durante el estudio se consideraron como no tolerantes. Aparte de los 102 receptores reclutados en el estudio, se incluyeron 79 (33 tolerantes y 46 no tolerantes) en el actual estudio. Las muestras de sangre y biopsias hepáticas disponibles para el estudio se obtuvieron antes de que se interrumpieran los fármacos inmunosupresores tanto de los receptores tolerantes (**TOL**, n=33) como de los no tolerantes (**No-TOL**, n=46), en el momento del rechazo de los receptores no tolerantes (n=14), y al final del estudio en los pacientes tolerantes (n=4). Además, las muestras de tejido hepático se obtuvieron también de los siguientes grupos de pacientes: a) receptores de trasplante hepático con hepatitis crónica debida a una infección recurrente por el virus de la hepatitis C (**HEPC**, n=12); b) receptores de trasplante hepático con rechazo celular agudo típico que tiene lugar durante el periodo inmediato al post-trasplante (**REJ**, n=9); c) receptores de trasplante hepático bajo el mantenimiento de la inmunosupresión con función hepática normal e histología hepática normal tras 1 año del trasplante (**CONT-Tx**, n=8); y d) pacientes no trasplantados que se someten a cirugía por metástasis colorrectales hepáticas (**CONT**, n=10). Los receptores participantes se reclutaron del Hospital Clínic de Barcelona (España), Universidad Tor Vergata de Roma (Italia) y Hospital Universitario de Lovaina (Bélgica). El estudio fue aprobado por los tres consejos institucionales de revisión y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes en estudio. Las características clínicas y demográficas de los pacientes incluidos en el estudio se resumen en la **Tabla 1** y el esquema del diseño del estudio se describe en la **Figura 1**. Una descripción detallada de la población de pacientes y de los resultados clínicos del ensayo clínico sobre la retirada de la inmunosupresión se presentará en otro lugar.

40 Ejemplo 2. Muestras de biopsia hepática y evaluación histológica.

Las biopsias hepáticas se llevaron a cabo de forma percutánea bajo anestesia local. Se preservó inmediatamente una porción de 2-3 mm del cilindro de la aguja de la biopsia hepática en reactivo RNAlater (Ambion, Austin, EE.UU.), se mantuvo a 4°C durante 24h y se criopreservó después en nitrógeno líquido tras eliminar el reactivo RNAlater. El cilindro restante se fijó con formalina y se embebió en parafina. En los pacientes CONT las biopsias hepáticas quirúrgicas de hígado no tumoral se obtuvieron y procesaron como se ha descrito previamente. Para el análisis histológico se tiñeron muestras de 3 µm de espesor utilizando hematoxilina-eosina. Tricómico de Masson para el análisis del tejido conectivo y tinción de Perl para la evaluación de contenido en hierro. El examen histológico se llevó a cabo por el mismo patólogo (R.M.) que trabajaba ciego para todos los datos clínicos y biológicos. Los siguientes aspectos histopatológicos fueron valorados y puntuados semicuantitativamente: 1) número de tractos portales completos; 2) número de venas centrales; 3) arquitectura parenquimal global; 4) inflamación lobular; 5) perivenulitis de las venas centrales; 6) inflamación del tracto portal; 7) lesiones de los conductos biliares; 8) pérdida de conductos biliares; 9) presencia de ramificaciones de las venas portales; 10) fibrosis portal; 11) fibrosis perisinusoidal. La puntuación detallada empleada para la clasificación se muestra en la Tabla Suplementaria 1. Para la evaluación semicuantitativa del contenido en hierro se empleó el sistema de puntuación modificado de Scheuer y el Resultado Total de Hierro (*Total Iron Score*, TIS) como se describe (Deugnier *et al. Hepatology* 1993; Scheuer *et al. J Pathol Bacteriol* 1962).

60 Ejemplo 3. Extracción y procesamiento del ARN.

Para la extracción total del ARN, se homogenizaron las muestras de tejido hepático criopreservadas en reactivo TRIzol (Invitrogen, San Diego, CA, EE.UU.) utilizando un mortero y tubos de reacción libres de nucleasa de 1,5 ml (Ambion). El ARN total se extrajo entonces siguiendo las guías del fabricante y se evaluó la calidad con el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.).

Ejemplo 4. Experimentos con el microarray de Illumina.

Se procesaron ciento cinco muestras de ARN hepático (20 TOL, 32 No-TOL, 14 No-TOL-Rej, 12 HEPC, 9 REJ, 8 CONT-Tx y 10 CONT; todas ellas del Hospital Clínic de Barcelona) a ARNc y se hibridaron sobre el *Illumina HumanHT-12 Expression BeadChips* que contiene 48,771 sondas correspondientes a 25,000 genes comentados (Illumina, Inc. San Diego, CA, EE.UU.). Los datos de expresión se calcularon utilizando el software de análisis de datos BeadStudio (Illumina, Inc.) y se procesaron posteriormente empleando la normalización por cuantiles utilizando el paquete bioconductor de Lumi [6]. A continuación, llevamos a cabo un paso conservativo de filtrado de sondas para excluir aquellas sondas con un coeficiente de variación del 5%, lo que resultó en la selección de un total de 33,062 sondas extraídas del grupo original de 48,771.

Ejemplo 5. Experimentos con el microarray de Affymetrix.

En un grupo seleccionado de 10 receptores TOL y 10 receptores No-TOL se repitieron los experimentos con microarray sobre chips *Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0* que cubren 47,000 genes comentados mediante 54,675 sondas (Affymetrix, Inc, Santa Clara, CA, EE.UU.) y que comprenden sondas de ácidos nucleicos comercialmente disponibles. Se llevaron a cabo experimentos adicionales con Affymetrix empleando el ARN extraído de 4 muestras hepáticas TOL-Post (4 de los 10 receptores TOL cuyo tejido de la biopsia hepática, que se obtuvo 12 meses después de completar la retirada de los fármacos, estaba también disponible). Los datos de la expresión génica se normalizaron utilizando el algoritmo sólido de multiarray por el contenido ajustado de guanidina-citosina, que calcula los valores de expresión a partir de la intensidad de la sonda incorporando información de la secuencia de la sonda. Por lo tanto, empleamos un paso conservativo de filtrado de sondas para excluir las sondas que no alcanzaron un valor de expresión \log_2 de 5 en al menos una muestra, lo que resultó en la selección de un total de 18,768 sondas extraídas del grupo original de 54,675.

Ejemplo 6. Análisis de datos de la expresión génica por microarray.

Para identificar genes expresados diferencialmente entre los diferentes grupos de estudio con el microarray, empleamos el *Análisis de Significancia de Microarray* (SAM). SAM utiliza la prueba estadística de la t modificada para cada gen de un grupo de datos y un factor de corrección para calcular el valor de t , controlando así las desviaciones estándar irrealmente bajas para cada gen. Además, SAM permite controlar la tasa de falsos descubrimientos (FDR) seleccionando un umbral para la diferencia entre el resultado actual de la prueba y el resultado obtenido por permutaciones repetidas de los grupos evaluados. Para el presente estudio empleamos la selección SAM utilizando una $FDR < 10\%$ y 1000 permutaciones. Para representar gráficamente las diferencias en la expresión génica globales entre los diferentes grupos de estudio, se utilizó la lista completa de sondas filtradas para llevar a cabo un análisis de correspondencia como el implementado en la función del *análisis-entre-grupos* (BGA) incluida en el paquete *made4* (Culhane AC, et al. Bioinformatics 2005). Este método es capaz de visualizar datos altamente dimensionales como las mediciones múltiples de la expresión génica en un gráfico 2D en el que las áreas delimitadas por las elipses representan el 95% de la distribución binormal estimada de las puntuaciones de las muestras en el primer y segundo eje. Para determinar si el grupo de genes de interés estaba significativamente asociado con los resultados clínicos (tolerancia vs. rechazo), las variables clínicas (edad del donante y receptor, género, tipo de tratamiento inmunosupresor, tiempo desde el trasplante) y las características histológicas (contenido en hierro), se empleó el software de Globaltest (Goeman, et al. Bioinformatics 2004). Se empleó también una sintaxis dentro de este software para corregir la asociación encontrada entre la expresión génica y los resultados clínicos por los posibles efectos de confusión de las molestas covariables clínicas de las que se encontró que eran estadísticamente diferentes entre receptores tolerantes y no tolerantes.

Ejemplo 7. Experimentos de PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real.

Para validar los resultados de expresión por microarray, se midieron los patrones de expresión de un grupo de 104 genes diana y 3 genes constitutivos (Tabla Suplementaria 1) empleando el sistema de detección de secuencias ABI 7900 y las tarjetas microfluidicas TaqMan LDA (Applied Biosystems, Carlsbad, EE.UU.), que comprenden oligonucleótidos cebadores disponibles comercialmente, sobre un subgrupo de 48 receptores (18 TOL y 31 No-TOL; todos ellos del Hospital Clínic de Barcelona). Además, los experimentos de qPCR se llevaron a cabo en un grupo independiente de 10 receptores TOL y 11 No-TOL proporcionados por la Universidad Tor Vergata de Roma y el Hospital Universitario de Lovaina y cuyos datos del microarray no están disponibles. Los genes diana se seleccionaron basándose en: 1) resultados de los experimentos con el microarray de Illumina y Affymetrix; 2) biomarcadores transcripcionales sanguíneos previamente descritos por nuestro grupo ya que están asociados con la tolerancia hepática operacional (M. Martínez-Llordella et al. J Clin Invest 2008); y 3) genes inmunorreguladores destacados descritos en la literatura. Se eliminó el ADN de las preparaciones de ARN total utilizando el tratamiento Turbo DNA-free DNase (Ambion), y se retrotranscribió el ARN en ADNc utilizando el Kit de Alta Capacidad de Transcripción Inversa ADNc (Applied Biosystems). Para cuantificar los niveles de transcripción de los genes diana se normalizaron los valores Ct con los genes constitutivos para generar valores ΔCt . Los resultados se calcularon entonces como la expresión relativa entre el ADNc de las muestras diana y una muestra calibrada de acuerdo con el método $\Delta\Delta Ct$. Los siguientes tres ejemplos se emplearon como calibradores: 1) conjunto de ARNs proveniente de 8 muestras CONT-Tx; 2) conjunto de ARNs proveniente de 10 muestras CONT; y 3) ARN hepático comercialmente disponible (*Human Liver Total RNA*, Ambion).

Ejemplo 8. Identificación y validación de los clasificadores de genes.

Para desarrollar clasificadores de la expresión génica por qPCR a partir de biopsias para predecir el éxito de la retirada de la inmunosupresión, llevamos a cabo una búsqueda exhaustiva de modelos predictivos empleando el análisis discriminante lineal y algoritmos de regresión logística implementados en el software de penalización posterior de la clasificación errónea (*misclassification penalized posterior*, MiPP). MiPP se basa en un modelo de clasificación incremental paso a paso para descubrir los modelos diagnósticos más parsimoniosos y emplea una estrategia de doble validación cruzada. En primer lugar, para obtener los modelos óptimos mientras que se evitan los riesgos de una larga búsqueda de cribado, llevamos a cabo un paso de validación cruzada con 10 subconjuntos sobre el grupo de entrenamiento de 18 receptores hepáticos TOL y 31 No-TOL del Hospital Clínic de Barcelona. A continuación, se llevó a cabo una validación cruzada con divisiones aleatorias de los modelos diagnósticos sobre el conjunto completo de datos (que incluía las 56 muestras de Barcelona y 21 muestras de Roma y Lovaina) dividiéndolo repetidamente en grupos de entrenamiento (2/3) y en grupos de evaluación independiente (1/3) para la validación del modelo externo. Para cada modelo identificado en el grupo de entrenamiento el valor de corte para la probabilidad óptima de tolerancia se calculó empleando el análisis ROC. El uso de un gran número de divisiones aleatorias de grupos de pruebas y entrenamiento nos permitió obtener intervalos de confianza de la precisión del diagnóstico. Basándonos en estos intervalos de confianza, la realización del diagnóstico y las tasas medias de clasificación errónea se obtuvieron para cada uno de los clasificadores candidatos. Para demostrar que la interpretación de los modelos no era centro-dependiente, calculamos entonces SN, SP, NPV, PPV y las tasas de error globales para las muestras recogidas de Barcelona y para aquellas obtenidas de Roma y Lovaina.

Ejemplo 9. Mediciones de la hepcidina sérica.

Las muestras séricas se obtuvieron a partir de los 64 receptores de hígado reclutados al inicio utilizando el BD Vacutainer SST II (BD Bioscience, Franklin Lakes, EE.UU.) y almacenado a -80°C. Las mediciones cuantitativas de hepcidina sérica se llevaron a cabo mediante una combinación de cromatografía de intercambio catiónico débil y espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF SM). Para la cuantificación se empleó un análogo de la hepcidina (hepcidina sintética-24; Peptide International Inc.) como estándar interno. El espectro del péptido se generó con una plataforma TOF MScon con ionización/desorción láser asistida por matriz con Microflex LT (Bruker Daltonics). Las concentraciones de hepcidina-25 sérica se expresaron en nmol/l. El límite de detección inferior de este método fue de 0.5 nM; los coeficientes medios de variación fueron 2.7% (intra-ensayo) y 6.5% (inter-ensayo). El nivel medio de referencia de hepcidina-25 sérica es 4.2 nM, con un rango de 0.5 – 13.9 nM.

Ejemplo 10. Ensayo comparativo entre el método para el diagnóstico de la tolerancia en el trasplante de hígado comprendido en el estado de la técnica y el método de la invención.

El método del estado de la técnica comprende la medición en muestras de sangre periférica de la expresión de un grupo de genes (*KLRF1, PTGDR, NCALD, CD160, IL2RB, PTCH1, ERBB2, KLRB1, NKG7, KLRD1, FEZ1, GNPTAB, SLAMF7, CLIC3, CX3CR1, WDR67, MAN1A1, CD9, FLJ14213, FEM1C, CD244, PSMD14, CTBP2, ZNF295, ZNF267, RGS3, PDE4B, ALG8, GEMIN7*) diferentes de los presentados en la presente invención. Además, este ejemplo muestra que el método de la invención tiene un mayor poder discriminativo.

El método del estado de la técnica da lugar a los siguientes resultados:

A) Combinación de *FEM1C* e *IL8*:

SN=63%; SP=80.77%; ER= 7.08%; PPV=77.68%; NPV=72.41%

B) Combinación de *KLRF1* y *SLAMF7*

SN= 27.7%, SP 92.31%, ER= 37.5%, PPV=73.68%, NPV=72.41%

C) Combinación de *KLRF1* y *IL2RB*

SN= 50%, SP= 84.62%, ER=31.25%, PPV= 73.33%, NPV=66.67%

SN: sensibilidad

SP: especificidad

ER: tasa de error

PPV: valor predictivo positivo

NPV: valor predictivo negativo

Sin embargo, el método de la presente invención basado en la medición de los genes comprendidos en las **Tablas 3, 4 y 6** en tejido hepático de los mismos 48 pacientes (se seleccionaron los tres mejores modelos realizados para este ensayo comparativo) condujo a los siguientes resultados:

A) Combinación de *TFRC, CDHR2, HMOX1, MIF, HAMP, IFNG, PEBP1, SLC5A12, ADORA3*:

SN=77.27%, SP=96.15%, ER=12.5%, PPV=94.44%, NPV=83.33%

B) Combinación de *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *ADORA3*:

SN=90.91%, SP=84,62%, ER=12.5%, PPV=83.33%, NPV=91.67%

5

C) Combinación de *TFRC*, *IFNG*, *HAMP*, *CDHR2*:

SN=77.27%, SP=88.46%, ER=16.67%, PPV=85%, NPV=82.14%

SN: sensibilidad

SP: especificidad

ER: tasa de error

10

PPV: valor predictivo positivo

NPV: valor predictivo negativo

15

Por lo tanto, se concluyó que la medición de la expresión de los genes comprendidos en la presente invención en muestras de tejido hepático, parece ser, al menos, tan precisa como la medición de los genes comprendidos en el estado de la técnica en sangre periférica, para identificar los receptores de hígado que pueden abandonar con éxito la medicación inmunosupresora porque son tolerantes al trasplante.

REFERENCIAS

1. Lerut, J., and Sanchez-Fueyo, A. 2006. An appraisal of tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 6:1774-1780.
- 5 2. N. Najafian et al., "How can we measure immunologic tolerance in humans?" *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, vol. 17, pp. 2652-63.
3. Newell et al., "Tolerante assays: measuring the unknown", *Transplantation* 2006, vol. 81, pp. 1503-9.
4. J. Cai et al., "Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8+ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance", *J. Exp. Med.* 2004, vol. 199, pp. 1017-23.
- 10 5. E. Jankowska-Gan E et al., "Human liver allograft acceptance and the "tolerance assay", *Hum. Immunol.* 2002, vol. 63, pp. 862-70.
6. P. Sagoo et al., "Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans", *J.Clin. Invest.* 2010, vol. 120, pp. 1848-61.
7. S. Brouard et al., "Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation", *Am. J. Transplant.* 2005, vol. 5, pp. 330-40.
- 15 8. G.V. Mazariegos et al., "Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients", *Am. J. Transplant.* 2003, vol. 3, pp. 689-96.
9. Y. Li et al., "Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation", *Am. J. Transplant.* 2004, vol. 4, pp. 2118-25.
- 20 10. M. Martinez-Llordella et al. Multiparameter of immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 2007, vol. 7, pp.309-19.
11. I.Puig-Pey et al. Characterization of gammadelta T cell subsets in organ transplantation. *Transplant. Int.* 2010. Epub.
12. S. Brouard et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2007, vol. 104, pp. 15448-53.
- 25 13. K.A. Newell et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* 2010, vol. 120, pp. 1836-47.
14. Y.M. Deugnier et al. Differentiation between heterozygotes and homozygotes in genetic hemochromatosis by means of a histological hepatic iron index: a study of 192 cases. *Hepatology* 1993, vol. 17, pp. 30-4.
- 30 15. P.J. Scheuer et al. Hepatic pathology in relatives of patients with haemochromatosis. *J. Pathol. Bacteriol.* 1962, vol. 84, pp. 53-64.
16. A.C. Culhane et al. MADE4: an R package for multivariate analysis of gene expression data. *Bioinformatics.* 2005, vol. 21, pp. 2789-90.
- 35 17. J.J.Goeman et al. A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome. *Bioinformatics.* 2004, vol. 20, pp. 93-9.

REIVINDICACIONES

1. Método para el diagnóstico o pronóstico *in vitro* del estado de tolerancia de un paciente sometido a un trasplante hepático que comprende:
 - a. Medición, en una muestra biológica obtenida del aloinjerto hepático del paciente bajo investigación, de los niveles de expresión de al menos uno de los siguientes genes o combinaciones de los mismos: *TFRC*, *CDHR2*, *HMOX1*, *MIF*, *HAMP*, *IFNG*, *PEBP1*, *SLC5A12*, *ADORA3* y *DAB2*;
 - b. Evaluación de la tolerancia o no tolerancia del paciente bajo investigación al trasplante de hígado mediante la comparación del nivel de expresión de al menos uno de los genes o combinaciones de los mismos, del paso a), con el nivel de expresión de los mismos genes o combinaciones de los mismos, obtenido a partir de una muestra de referencia.
2. Método, según la reivindicación 1, donde la muestra de referencia es una muestra de ARN seleccionada entre: un conjunto de ARNs obtenido de un tejido hepático no trasplantado sano; un ARN de referencia disponible comercialmente; o un ARN de referencia absoluta que consiste en una muestra que contiene un número previamente cuantificado de moléculas de ARN.
3. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque los genes *TFRC* y *MIF* están sobre-regulados, y los genes *CDHR2*, *HMOX1*, *HAMP*, *IFNG*, *PEBP1*, *SLC5A12*, *ADORA3* y *DAB2* están infra-regulados, en receptores de trasplante hepático tolerantes comparado con el nivel de expresión de los mismos genes tomados de la muestra de referencia de ARN.
4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende la medición de los niveles de expresión de al menos una de las siguientes combinaciones de genes: *LC5A12*, *VNN3*, *TFRC*, *SOCS1*, *MIF*, *TTC3*, *RBM23*, *PEBP1*, *SH2D1B*, *NCR1*, *DAB2* y *ADORA3*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *HAMP*, *TUBA4A*, *TTC3*, *HMOX1*, *VNN3*, *NCR1*, *ADORA3*, *TAF15*, *IFNG*, *SOCS1* y *TIPARP*; *MOX1*, *CDHR2*, *MIF*, *PEBP1*, *TFRC*, *SLC5A12*, *SOCS1*, *HAMP*, *VNN3* y *IFNG*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *SLC5A12*, *HAMP*, *SOCS1*, *IFNG* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *HAMP*, *MIF*, *PEBP1*, *VNN3*, *SOCS1*, *HMOX1* y *DAB2*; *TFRC*, *DAB2*, *MIF*, *PEBP1*, *IFNG*, *HAMP*, *SLC5A12*, *SOCS1*, *VNN3*, *ADORA3*, *CDHR2*, *MCOLN1* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *HMOX1*, *MCOLN1*, *MIF*, *HAMP*, *ADORA3*, *CDHR2*, *PEBP1* y *SOCS1*; *EBP1*, *TFRC*, *HMOX1*, *IFNG*, *MCOLN1*, *SOCS1*, *MIF*, *CDHR2*, *HAMP* y *ADORA3*; *TFRC*, *PEBP1*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *VNN3*, *HMOX1*, *DAB2*, *SOCS1*, *MIF* y *HAMP*; *DHR2*, *ADORA3*, *IFNG*, *TFRC*, *VNN3*, *HMOX1*, *PEBP1*, *MIF*, *SLC5A12*, *HAMP*, *SOCS1* y *MCOLN1*; *LC5A12*, *TFRC*, *IFNG*, *MIF*, *DAB2*, *HMOX1*, *CDHR2*, *SOCS1*, *HAMP*, *PEBP1*, *VNN3*, *ADORA3* y *MCOLN1*; *TFRC*, *SOCS1*, *HMOX1*, *PEBP1*, *VNN3*, *CDHR2*, *HAMP*, *IFNG*, *DAB2*, *MCOLN1*, *ADORA3* y *MIF*; *TFRC*, *PEBP1*, *VNN3*, *SOCS1*, *MIF*, *HMOX1*, *DAB2*, *HAMP*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3* y *MCOLN1*; *LC5A12*, *MIF*, *CDHR2*, *TFRC*, *IFNG*, *ADORA3*, *HAMP*, *VNN3*, *SOCS1*, *MCOLN1*, *PEBP1* y *HMOX1*; *TFRC*, *IFNG*, *CDHR2*, *ADORA3*, *PEBP1*, *VNN3*, *MIF*, *HMOX1*, *MCOLN1*, *SOCS1*, *SLC5A12*, *DAB2* y *HAMP*; *TFRC*, *VNN3*, *HAMP*, *CDHR2*, *SLC5A12*, *HMOX1*, *SOCS1*, *PEBP1* y *MIF*; *AB2*, *TFRC*, *MIF*, *CDHR2*, *PEBP1*, *VNN3*, *TTC3*, *HMOX1* y *SOCS1*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *CDHR2*, *VNN3*, *IFNG*, *MCOLN1* y *SOCS1*; *TFRC*, *PEBP1*, *MIF*, *SOCS1* y *CDHR2*.
5. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde se miden los niveles de expresión de la combinación de genes que consiste en *TFRC*, *IFNG* y *CDHR2*.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que además comprende la determinación de al menos un parámetro adicional útil para el diagnóstico o pronóstico.
7. Método según la reivindicación 6 donde este parámetro adicional es el nivel sérico de Hecpidina.
8. Método según la reivindicación 6 donde este parámetro adicional es la edad y/o el tiempo tras el trasplante.

Figura 1

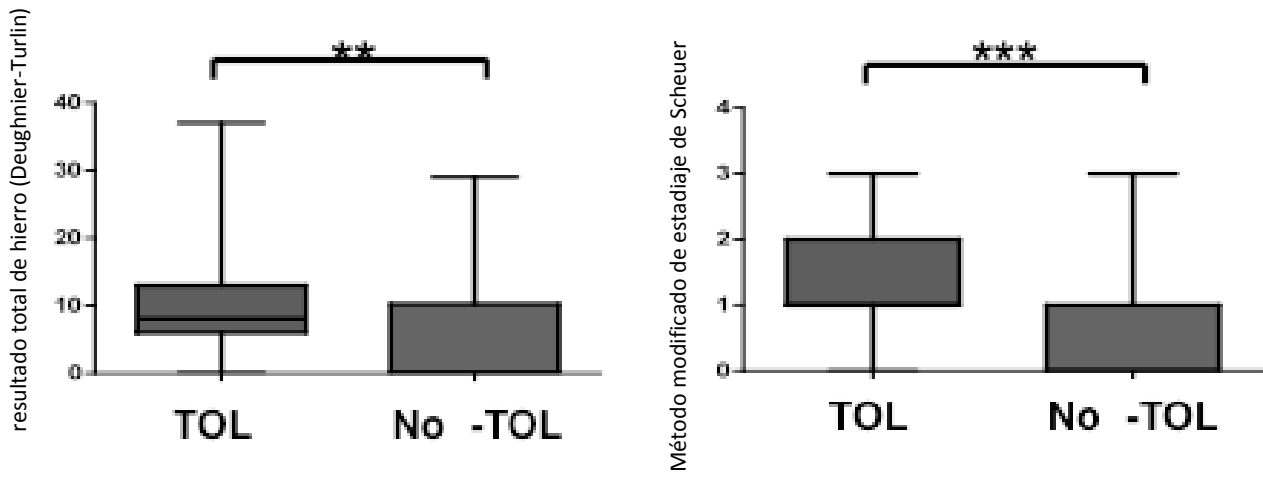


Figura 2

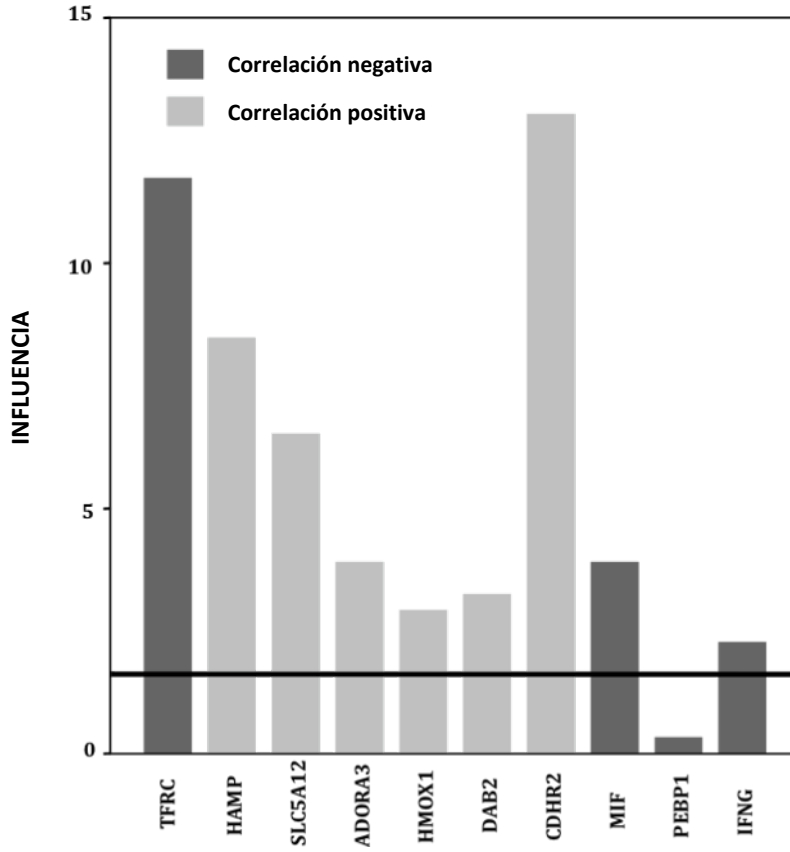
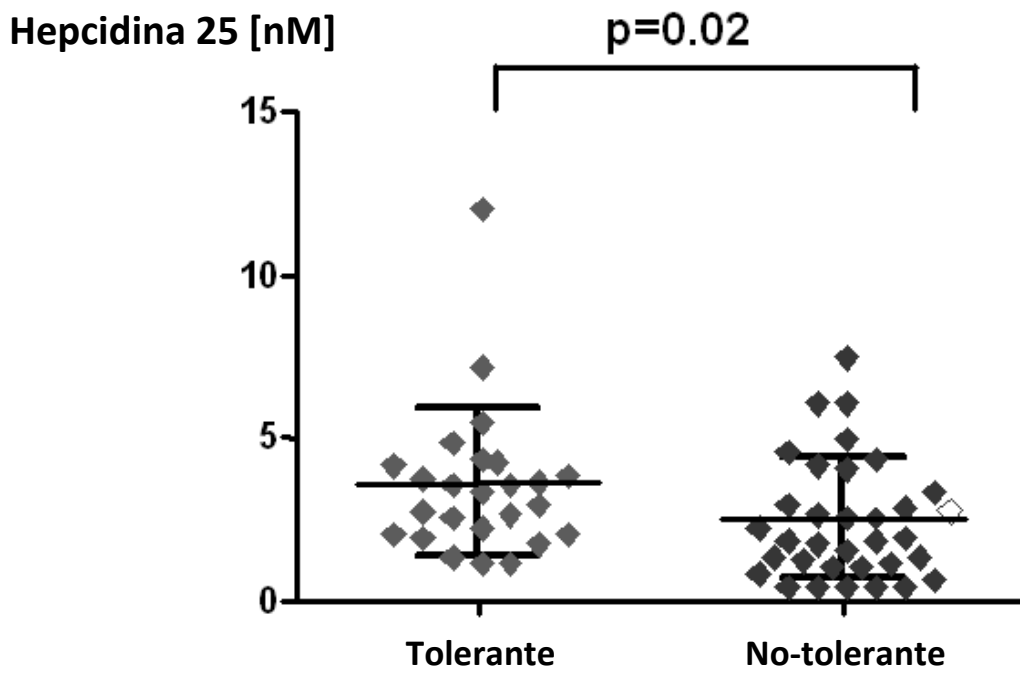


Figura 3



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 2010000320 A1 [0004]

Literatura no patente citada en la descripción

- **PUIG-PEY et al.** *Transplant Int*, 2010 [0005]
- **S.BROUARD et al.** *PNAS*, 2007 [0005]
- **M. MARTINEZ-LLORDELLA et al.** *J Clin Invest*, 2008 [0005]
- **K.NEWELL et al.** *J Clin Invest*, 2010 [0005]
- **P.SAGOO et al.** *J Clin Invest*, 2010 [0005]
- **BENITEZ C et al.** *American Transplant Congress, San Diego, CA*, 03 May 2010 [0037]
- **DEUGNIER et al.** *Hepatology*, 1993 [0040]
- **SCHEUER et al.** *J Pathol Bacteriol*, 1962 [0040]
- **CULHANE AC et al.** *Bioinformatics*, 2005 [0044]
- **GOEMAN et al.** *Bioinformatics*, 2004 [0044]
- **M.MARTINEZ-LLORDELLA et al.** *J Clin Invest*, 2008 [0045]
- **LERUT, J. ; SANCHEZ-FUEYO, A.** An appraisal of tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant*, 2006, vol. 6, 1774-1780 [0052]
- **N. NAJAFIAN et al.** How can we measure immunologic tolerance in humans?. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2006, vol. 17, 2652-63 [0052]
- **NEWELL et al.** Tolerante assays: measuring the unknown. *Transplantation*, 2006, vol. 81, 1503-9 [0052]
- **J. CAI et al.** Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8+ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance. *J. Exp. Med.*, 2004, vol. 199, 1017-23 [0052]
- **E. JANKOWSKA-GAN E et al.** Human liver allograft acceptance and the "tolerance assay. *Hum. Immunol.*, 2002, vol. 63, 862-70 [0052]
- **P. SAGOO et al.** Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J.Clin. Invest.*, 2010, vol. 120, 1848-61 [0052]
- **S. BROUARD et al.** Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am. J. Transplant.*, 2005, vol. 5, 330-40 [0052]
- **G.V. MAZARIEGOS et al.** Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients. *Am. J. Transplant.*, 2003, vol. 3, 689-96 [0052]
- **Y. LI et al.** Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am. J. Transplant.*, 2004, vol. 4, 2118-25 [0052]
- **M. MARTINEZ-LLORDELLA et al.** Multiparameter of immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am. J. Transplant.*, 2007, vol. 7, 309-19 [0052]
- **I.PUIG-PEY et al.** Characterization of gammadelta T cell subsets in organ transplantation. *Transplant. Int.*, 2010 [0052]
- **S. BROUARD et al.** Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2007, vol. 104, 15448-53 [0052]
- **K.A. NEWELL et al.** Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.*, 2010, vol. 120, 1836-47 [0052]
- **Y.M. DEUGNIER et al.** Differentiation between heterozygotes and homozygotes in genetic hemochromatosis by means of a histological hepatic iron index: a study of 192 cases. *Hepatology*, 1993, vol. 17, 30-4 [0052]
- **P.J. SCHEUER et al.** Hepatic pathology in relatives of patients with haemochromatosis. *J. Pathol. Bacteriol.*, 1962, vol. 84, 53-64 [0052]
- **A.C. CULHANE et al.** MADE4: an R package for multivariate analysis of gene expression data. *Bioinformatics*, 2005, vol. 21, 2789-90 [0052]
- **J.J.GOEMAN et al.** A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome. *Bioinformatics*, 2004, vol. 20, 93-9 [0052]