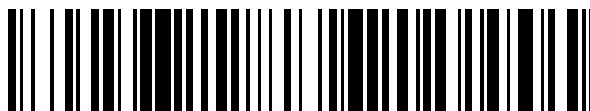


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 682**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6883** (2008.01)

**C12Q 1/6881** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2014 PCT/US2014/040055**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14194113**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2014 E 14804474 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 3004388**

54 Título: **Detección y cuantificación de ADN extracelular del donante en la circulación de receptores de trasplantes de órganos**

30 Prioridad:

**29.05.2013 US 201361828553 P**

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

**19.03.2019**

73 Titular/es:

**CHRONIX BIOMEDICAL (100.0%)  
5941 Optical Court, Suite 203E  
San Jose, California 95138, US**

72 Inventor/es:

**SCHUTZ, EKKEHARD y  
BECK, JULIA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 704 682 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

Detección y cuantificación de ADN extracelular del donante en la circulación de receptores de trasplantes de órganos

5 **Antecedentes de la invención**

Usando técnicas modernas de biología molecular, es factible la detección de pequeñas cantidades de material genético divergente en una sola muestra. Esto tiene aplicaciones potenciales para una serie de afecciones, tales como el diagnóstico prenatal, el diagnóstico de tumores y la detección del rechazo de trasplantes. Se ha informado un aumento del ADN de donantes de corazón en la circulación de receptores de trasplantes de corazón estables durante episodios de rechazo (Snyder, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 108:6229-6234, 2011). Sin embargo, para ser clínicamente útil, el método utilizado para la detección de ADN de injerto no solo debe ser específico y sensible, sino que también debe tener un tiempo de respuesta rápido y ser económicamente factible. Los métodos descritos requieren mucho tiempo y son costosos de realizar (Lo, Clin Chem 57:941-942, 2011).

Los métodos simplificados para diferenciar entre el ADN de los donantes y los receptores pueden implicar el uso de polimorfismos de único nucleótido (SNP, forma siglada de *single-nucleotide-polymorphisms*). Una posibilidad es investigar al donante y al receptor en cuanto a determinados SNP y usarlos, donde ambos SNP son homocigóticos, pero distintos en el donante y el receptor. Sin embargo, esto requeriría que el ADN del donante esté disponible, lo que no siempre es el caso en el contexto clínico, en particular si el trasplante fue hace algunos años. Por lo tanto, existe la necesidad de técnicas sensibles y de fácil implementación para la detección temprana del rechazo de trasplantes.

25 **Breve resumen de la invención**

En el presente documento se proporciona un método para evaluar la integridad de un trasplante en un receptor, comprendiendo el método controlar el nivel de ADN extracelular (ADNe) de injerto mediante la evaluación de la cantidad de un alelo de SNP del donante en una muestra de ADNe obtenida de la sangre de un paciente, en donde el alelo de SNP se preselecciona con una frecuencia del alelo menos común (MAF) de al menos 0,4 y, además, en donde el alelo de SNP del donante está presente en el donante y el receptor es homocigótico para un alelo alternativo, en donde el alelo de SNP se identifica sin emplear una muestra de un donante distinta.

Además, se proporciona un método para detectar un SNP de un donante para controlar la integridad del trasplante en un receptor que recibe tejido de dicho donante, comprendiendo el método (a) identificar que un SNP que tiene una frecuencia del alelo menos común de 0,4 o mayor es homocigótico en el receptor, (b) amplificar extracelular (ADNe) de una muestra de suero o plasma obtenida del receptor al menos 5 días después del trasplante de material procedente del donante, (c) realizar una reacción de PCR cuantitativa para los SNP identificados en (a), para detectar la presencia del alelo alternativo para uno o más de los SNP; y (d) seleccionar un SNP donde el SNP alternativo está presente en el ADNe amplificado para controlar la integridad del trasplante del paciente.

Además, se proporciona un método para detectar un SNP de un donante para controlar la integridad del trasplante en un receptor que recibe tejido de dicho donante, comprendiendo el método (a) identificar que un SNP que tiene una frecuencia del alelo menos común de 0,4 o mayor es homocigótico en el receptor, (b) amplificar extracelular (ADNe) de una muestra de sangre obtenida del receptor 24 horas o menos después del trasplante de material de injerto procedente del donante, (c) identificar un SNP que tiene una frecuencia del alelo menos común de 0,4 o mayor como homocigótico en el donante usando el ADNe de la etapa (b), (d) realizar una reacción de PCR cuantitativa para los SNP identificados en (a) para detectar la presencia del alelo alternativo para uno o más de los SNP en el donante, y (e) seleccionar un SNP donde el SNP alternativo sea homocigótico en el donante.

Además, se proporciona el uso del método de la invención para detectar daño por reperfusión en el tejido del donante en un receptor de trasplante, detectar daño en el tejido hepático del donante por un virus de la hepatitis en un receptor de trasplante, detectar una nefropatía crónica del injerto o detectar una vasculopatía del injerto, determinar la dosis eficaz mínima de un fármaco inmunodepresor y/o detectar el daño del trasplante por anticuerpos específicos de donante o una lesión crónica del trasplante.

Además, se proporciona un método para controlar la integridad de un trasplante en un receptor de trasplante, comprendiendo el método, cuantificar, en una muestra de ADNe obtenida del receptor del trasplante, la cantidad de un alelo de SNP del donante para un SNP seleccionado por un método de la invención.

A continuación se resumen determinados aspectos de la divulgación. La divulgación no se limita a los aspectos particulares descritos en este resumen.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para detectar el rechazo del trasplante en un paciente, basado en el uso de SNP que se han investigado por su frecuencia del alelo menos común (MAF), donde tales frecuencias son de 0,2 o más altas. La MAF es de 0,40 o más alta. Por ejemplo, asumiendo el equilibrio de Hardy-Weinberg, un SNP con una MAF de ~0,40 mostraría homocigosis tanto en el donante como en el receptor el 23 %-25 % de las

veces para cada alelo. La probabilidad de que ambos tengan un alelo distinto (homocigótico) es, por lo tanto, de ~11,3 % a ~12,5 %. Para identificar al menos tres de tales SNP en personas de raza blanca, se pueden investigar de 30 a 35 SNP distintos con las características mencionadas. Por el contrario, si se emplearon SNP no seleccionados, se puede estimar que se necesitan más de 3.000 ensayos para lograr el mismo poder de discriminación, basándose en la MAF mediana global de 0,023 informada para los SNP humanos conocidos en personas de raza blanca (por ejemplo, para el chip de perlas de HumanOmni5M de Illumina).

Usando tales comparaciones de SNP, la cantidad de ADN de injerto liberado en la circulación por un órgano puede evaluarse y usarse como un biomarcador para la integridad del órgano. Además, una vez que se identifican los SNP que difieren entre el donante y el receptor, solo necesitan medirse posteriormente los SNP con la mejor sensibilidad (por ejemplo, homocigóticos en ambos, pero distintos en el donante y el receptor). La única limitación de tal método es la cantidad de ADN que se investiga, que se debe principalmente al volumen de sangre que se analiza. Por ejemplo, se puede estimar que el número de equivalentes de genoma en un mililitro de sangre es de aproximadamente mil. Si todas las moléculas participan en una reacción de PCR y el ADN de injerto representa el 5 % del ADN, entonces habría 50 moléculas de tal tipo en 1 ml de sangre. El análisis completo de varios SNP distintos, por lo tanto, cuando se trabaja con muestras pequeñas, implica como primera etapa la amplificación aleatoria no sesgada del ADN extraído procedente de una muestra de sangre, por ejemplo, una muestra de al menos 2 ml de sangre. Dicha etapa de amplificación se puede hacer mediante varias técnicas, para el ADN apoptótico habitualmente corto (por ejemplo, Beck *et al.*, Clin Chem 55: 730-738, 2009), suele ser más adecuado el ligamiento de un adaptador directo (Lo *et al.*, Sci Transl Med 2: 61ra91, 2010). Una vez que los adaptadores de amplificación están ligados, se realiza un número moderado de ciclos de amplificación (generalmente no más de 12 a 15) y se eliminan los cebadores y adaptadores de la biblioteca resultante, y se utiliza como molde para las investigaciones de SNP. Si el tamaño de la muestra inicial no se limita a una muestra pequeña, la etapa de amplificación, a la que también se hace referencia en el presente documento como una etapa de preamplificación, se puede omitir.

Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona un método para detectar un SNP de un donante para controlar el estado del trasplante de un receptor que recibe tejido de dicho donante, comprendiendo el método: (a) identificar un SNP que tiene una frecuencia del alelo menos común de 0,20 o mayor, a menudo de 0,30 o mayor, o preferentemente de 0,40 o mayor, como homocigótico en el receptor; (b) amplificar extracelular (ADNe) de una muestra de suero o plasma obtenida del receptor al menos 5 días después del trasplante de material procedente del donante para generar una biblioteca de cf (forma siglada de *cell-free*, extracelular); (c) realizar una reacción de PCR digital para los SNP identificados en (a) para detectar la presencia de un alelo alternativo para uno o más de los SNP, y (d) seleccionar un SNP donde el alelo de SNP alternativo está presente en la biblioteca de cf para controlar el estado del trasplante del donante. Preferentemente, el SNP seleccionado en (d) es homocigótico en el donante, pero puede ser heterocigótico en el donante. La etapa (a) se puede realizar utilizando cualquier muestra del paciente que no contenga material del donante, por ejemplo, para identificar un SNP adecuado pueden usarse leucocitos de sangre periférica (los LSP) obtenidos del paciente. En aspectos alternativos, la etapa (a) se realiza utilizando la biblioteca de ADNe de la etapa (b). Por lo tanto, en algunos aspectos, por ejemplo, utilizando una muestra de LSP del paciente para obtener ADN, la etapa (a) se puede realizar antes o después de la etapa (b), mientras que en otros aspectos, se genera primero la biblioteca de ADNe amplificado. En algunos aspectos, un SNP adecuado a evaluar para controlar el estado del trasplante es un SNP expuesto en la Tabla 1. En algunos aspectos, se evalúan al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o todos los SNP expuestos en la Tabla 1 para determinar los SNP que son homocigóticos en el receptor.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para detectar un SNP de un donante para controlar el estado del trasplante de un receptor que recibe tejido de dicho donante, comprendiendo el método: (a) identificar que un SNP que tiene una frecuencia del alelo menos común de 0,20 o mayor, a menudo de 0,30 o mayor, o preferentemente de 0,40 o mayor, es homocigótico en el receptor; (b) amplificar extracelular (ADNe) de una muestra de sangre, por ejemplo, suero o plasma, obtenida del receptor 24 horas o menos después del trasplante de material de injerto del donante para generar una biblioteca de cf; (c) identificar un SNP que tiene una frecuencia del alelo menos común de 0,20 o mayor, a menudo de 0,30 o mayor, o preferentemente de 0,40 o mayor, como homocigótico en el donante usando la biblioteca de cf de la etapa (b); (d) realizar una reacción de PCR digital para los SNP identificados en (a) para detectar la presencia del alelo alternativo para uno o más de los SNP en el donante, y (e) seleccionar un SNP donde el alelo de SNP alternativo está presente en el donante. La etapa (a) se puede realizar utilizando cualquier muestra del paciente que no contenga material del donante, por ejemplo, para identificar un SNP adecuado pueden usarse leucocitos de sangre periférica (los LSP) obtenidos del paciente. En algunos aspectos, un SNP adecuado es un SNP expuesto en la Tabla 1. En algunos aspectos, se evalúan al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o todos los SNP expuestos en la Tabla 1 para determinar los SNP que son homocigóticos en el receptor.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método para detectar un SNP de un donante para controlar el estado del trasplante de un receptor que recibe tejido, a partir de dicho ADN del donante, comprendiendo el método: (a) identificar un SNP que tiene una frecuencia del alelo menos común de 0,20 o mayor, a menudo de 0,30 o mayor, o preferentemente de 0,40 o mayor, como homocigótico en un receptor utilizando una muestra de ADN del receptor a partir de una fuente que está exenta de ADN de donante, por ejemplo, ADN obtenido de una muestra de LSP del paciente; (b) identificar un SNP que tiene una frecuencia del alelo menos común de 0,20 o mayor, a menudo de 0,30

- o mayor, o preferentemente de 0,40 o mayor, como homocigótico en un receptor usando una muestra de ADN obtenida de células o tejido del donante; y (c) seleccionar un SNP que sea homocigótico en el receptor para el cual el donante sea homocigótico o heterocigótico para el alelo alternativo. En algunos aspectos, el genotipo de SNP se determina en el ADN del receptor y/o el donante para al menos 10, 20, 30 o 40 de los SNP identificados en la Tabla 1. En algunos aspectos, la evaluación de SNP puede emplear una o más sondas que tienen una secuencia como se muestra en la Tabla 1. Los SNP para los cuales el material de trasplante tiene un alelo distinto para el SNP, en comparación con el receptor, se pueden usar para la determinación futura del porcentaje de ADNe de injerto, por ejemplo, en una reacción de PCR digital.
- En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método para controlar el rechazo del trasplante en un receptor de trasplante, comprendiendo el método: obtener una muestra de ADNe del paciente; y detectar la presencia o ausencia, o cuantificar, un alelo de SNP del donante para un SNP seleccionado usando un método como se describe en el presente documento. En aspectos típicos, las muestras de ADNe se obtienen del paciente en los puntos de tiempo deseados después del trasplante y se cuantifica el nivel del alelo de SNP del donante.
- En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método para controlar el estado de un trasplante en un receptor de trasplante, para evaluar una terapia inmunodepresora, donde el método comprende cuantificar la cantidad de alelo de SNP del donante en los puntos de tiempo deseados y ajustar la terapia inmunodepresora, por ejemplo, ajustando la cantidad de fármaco inmunodepresor. Por lo tanto, puede identificarse la dosis más baja de un fármaco inmunodepresor para ese paciente individual.
- En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método para controlar el estado de un trasplante en un receptor de trasplante, por ejemplo, un receptor de trasplante de hígado, para determinar cambios en el estado del trasplante relacionados con la reactivación de un virus, tal como un virus de la hepatitis, donde el método comprende cuantificar la cantidad de alelo de SNP del donante como se describe en el presente documento, en la sangre de un receptor de trasplante.
- En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método para controlar el estado de un trasplante en un receptor de trasplante, para evaluar la lesión por reperfusión en el trasplante. En tales aspectos, las cantidades de ADNe de injerto (ADNei) se determinan a lo largo de un período de tiempo, por ejemplo, un período de tiempo de días o semanas, hasta un mes, después del trasplante. En aspectos típicos, el ADNei se controla durante los primeros 7 días después del injerto.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para determinar el estado de un órgano trasplantado, donde el órgano es un órgano subóptimo, en donde el método comprende determinar el nivel de ADNe de injerto presente en la sangre de un paciente. En algunos aspectos, el método comprende determinar el nivel de ADNe de injerto durante el transcurso de siete días, o hasta 30 días después del trasplante.
- En el presente documento se divulga un método para evaluar el estado del trasplante de un receptor de trasplante, comprendiendo el método controlar el nivel de ADNe de injerto mediante la evaluación de la cantidad de un alelo de SNP del donante en una muestra de ADNe obtenida de la sangre de un paciente, normalmente, donde el SNP tiene un MAF de al menos 0,20 o al menos 0,30, y a menudo de al menos 0.40, en donde el alelo de SNP del donante está presente en el donante y el receptor es homocigótico para un alelo alternativo. El donante puede ser heterocigótico u homocigótico para el alelo de SNP. En algunos aspectos, la cuantificación del nivel del alelo de SNP del donante en la muestra de ADNe comprende determinar el número de copias del alelo de SNP del donante en la muestra de ADNe. En algunos aspectos, la cuantificación del nivel del alelo de SNP del donante en la muestra de ADNe comprende determinar el porcentaje del alelo de SNP del donante en la muestra de ADNe. En algunos aspectos, el material trasplantado es un órgano subóptimo (*marginal organ*). En algunos aspectos, la muestra de ADNe procede de una muestra de sangre, por ejemplo, suero o plasma, que se obtiene diez días o más después del trasplante. En algunos aspectos, la muestra de ADNe se obtiene de una muestra de sangre, por ejemplo, suero o plasma, obtenida un año o más después del trasplante. En algunos aspectos, la muestra de ADNe procede de una muestra de sangre, por ejemplo, suero o plasma, que se obtiene en el espacio de siete días desde el trasplante. En algunos aspectos, controlar el nivel del ADNe de injerto en conformidad con la divulgación comprende además ajustar una pauta de administración, o la dosificación, de uno o más fármacos inmunodepresores. En algunos aspectos, el material del donante es un hígado, corazón y riñón. En algunos aspectos, el control del nivel del ADNe de injerto se puede realizar para controlar el daño del trasplante que puede surgir de los anticuerpos específicos de donante en la sangre del receptor. Por lo tanto, en algunos aspectos, un método de la divulgación puede comprender además detectar anticuerpos específicos de donante en la sangre del receptor.
- En un aspecto adicional, la divulgación proporciona además el uso de un método para controlar el ADNe de injerto utilizando un ensayo de SNP como se describe en el presente documento, para detectar daño del trasplante por diversas causas, incluyendo, pero sin limitación, daño por reperfusión del órgano en un receptor de trasplante, daño hepático por un virus de la hepatitis reactivado en un receptor de un trasplante de hígado, daño del trasplante producidos por anticuerpos específicos de donante o daño por una lesión crónica del trasplante, por ejemplo, nefropatía crónica en un trasplante de riñón o vasculopatía en un trasplante de corazón. En algunos aspectos, el método para controlar el ADNe de injerto usando un ensayo de SNP como se describe en el presente documento se

utiliza para determinar una pauta de administración eficaz mínima de un inmunodepresor.

### Breve descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1 proporciona un gráfico que muestra los coeficientes de variación (%) para 15 ensayos con una concentración de alelo menos común del 2 %. Para cada ensayo, se muestra el CV para el 2 % de alelo A y el 2 % de alelo B (barras negras). La precisión intraensayo se obtuvo en 9 repeticiones dentro de la misma serie con QX100 utilizando 100 ng de ADN de entrada total. Las barras grises muestran los CV teóricos calculados a partir del número de gotitas positivas para el alelo menos común.
- 10 La Figura 2 proporciona un esquema del procedimiento implementado para obtener medidas del contenido de ADNe de injerto.
- 15 La Figura 3 proporciona datos ilustrativos en cuanto al contenido de ADNe de injerto medido en la circulación de 10 pacientes con LTx (trasplante de hígado) estables, 9 con KTx (trasplante de riñón) estables y de 8 pacientes con HTx (trasplante de corazón) estables.
- 20 La Figura 4 proporciona datos ilustrativos de una medición de la evolución temporal del contenido de ADNe en la circulación de 3 pacientes con trasplantes de hígado. La primera muestra analizada se obtuvo del paciente LTx6 el día 1 después de la cirugía. Casi el 100 % del ADNe en el plasma del paciente es ADN procedente del injerto.
- 25 La Figura 5 proporciona datos ilustrativos de una medición de la evolución temporal de un paciente con LTx con un episodio de rechazo agudo en el día 43 después de la cirugía. El contenido de ADNe de injerto muestra un marcado aumento en el día 32 mucho antes de que los biomarcadores convencionales AST y bilirrubina indiquen el rechazo.
- La Figura 6 proporciona datos ilustrativos que comparan el ADNe de injerto medido como copias/ml con los valores expresados como porcentaje.
- 30 Las Figuras 7 y 8 proporcionan datos ilustrativos que muestran que los niveles sanguíneos subterapéuticos de Tacrólimus se asocian tanto con el ADNe de injerto (%) (Figura 7) como con el número de copias del ADNe de injerto (Figura 8).
- 35 La Figura 9 proporciona datos ilustrativos que muestran el número de copias de ADNe de injerto en diversos tiempos después del trasplante de hígado.
- La Figura 10 muestra los resultados obtenidos del análisis de ADNe de injerto del estado del trasplante de un receptor de trasplante que recibió un órgano subóptimo de donante en comparación con la amplitud observada en otros catorce pacientes.
- 40 La Figura 11 proporciona datos ilustrativos que muestran el curso temporal del ADNe de injerto necrótico durante los primeros días después del LTx.

### Descripción detallada de la invención

- 45 La expresión "ADN extracelular " o "ADNe", como se usa en el presente documento, significa moléculas de ADN libres de 25 nucleótidos o más que no están contenidas dentro de ninguna célula intacta. En el contexto de la actual divulgación, el "ADNe" se evalúa normalmente en sangre humana, por ejemplo, puede obtenerse a partir de suero o plasma humano.
- 50 Un "biomarcador de polimorfismo de único nucleótido (SNP)" en el contexto de la presente invención se refiere a un SNP donde un receptor de un trasplante es homocigótico para un alelo de SNP y el donante tiene al menos un alelo alternativo para ese SNP. Dicho SNP es un biomarcador para material de donante.
- 55 Un "perfil de SNP", como se usa en el presente documento, se refiere al patrón de alelos, es decir, qué alelos están presentes en una muestra.
- Un "injerto", como se usa en el presente documento, se refiere a material tisular procedente de un donante que se trasplanta a un receptor. Por ejemplo, un injerto puede ser de hígado, corazón, riñón o cualquier otro órgano.
- 60 El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que actúa como un punto de inicio de la síntesis de ADN en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador complementario a una cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de cuatro nucleósido trifosfatos distintos y un agente para la polimerización (es decir, ADN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Un cebador es preferiblemente un oligodesoxirribonucleótido monocatenario. El cebador incluye una "región de hibridación" exacta o sustancialmente complementaria a la secuencia diana, preferentemente, de aproximadamente
- 65

15 o aproximadamente 35 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido cebador puede consistir completamente en la región de hibridación o puede contener características adicionales que permitan la detección, inmovilización o manipulación del producto amplificado, pero que no alteran la capacidad del cebador para servir como reactivo de partida para la síntesis de ADN. Por ejemplo, puede incluirse una cola de una secuencia de ácido nucleico en el extremo 5' del cebador que hibride con un oligonucleótido de captura.

El término "sonda" se refiere a un oligonucleótido que hibrida de forma selectiva con un ácido nucleico diana en condiciones adecuadas. Una sonda para la detección de las secuencias de biomarcador descritas en el presente documento puede ser de cualquier longitud, por ejemplo, de 15-500 pb de longitud. Normalmente, en ensayos basados en sondas, son preferentes las sondas de hibridación que son de menos de 50 pb.

La expresión "secuencia diana" o "región diana" se refiere a una región de un ácido nucleico que se debe analizar y comprende la secuencia de interés, por ejemplo, una región que contiene un biomarcador de SNP.

Como se usa en el presente documento, los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a cebadores, sondas y fragmentos oligoméricos. Los términos no están limitados por la longitud y son genéricos para los polímeros lineales de polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) y cualquier otro N-glucósido de una base purínica o pirimidínica, o bases purínicas o pirimidínicas modificadas. Estos términos incluyen ADN bicatenario y monocatenario, así como ARN bicatenario y monocatenario. Los oligonucleótidos para su uso en la invención se pueden usar como cebadores y/o sondas.

Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender enlaces fosfodiéster o enlaces modificados que incluyen, pero sin limitación, un fosfotriéster, fosforamido, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamido, carbamato, tioéter, fosforamido puenteado, metilfosfonato puenteado, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato puenteado o enlaces sulfona, y combinaciones de tales enlaces.

Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender las cinco bases de origen biológico (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco bases de origen biológico. Estas bases pueden servir para varios propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para facilitar o inhibir la degradación de la sonda; o como puntos de unión para fracciones detectables o fracciones de desactivación. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener una o más fracciones de bases modificadas, no convencionales o derivatizadas, incluyendo, pero sin limitación, N6-metiladenina, N6-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5 (carboxihidroximetil)uracilo, 5 carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5 carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6 isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D mannosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2 tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos de fracciones de bases modificadas, no convencionales o derivatizadas, se pueden encontrar en las patentes de Estados Unidos N.º 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785, cada una de ellas incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad. Adicionalmente, un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender una o más fracciones de azúcar modificadas que incluyen, pero sin limitación, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

"Secuencias repetitivas" se refiere a elementos de ADN altamente repetidos presentes en un genoma. Estas secuencias habitualmente se categorizan en familias de secuencias y se clasifican ampliamente como ADN repetitivo intercalado (véase, por ejemplo, Jelinek y Schmid, Ann. Rev. Biochem. 51:831-844, 1982; Hardman, Biochem J. 234:1-11, 1986; y Vogt, Hum. Genet. 84:301-306, 1990) o ADN repetido en tándem. Los elementos repetitivos incluyen ADN satélite, minisatélite y microsatélite. En los seres humanos, el ADN repetitivo intercalado incluye secuencias de *Alu*, elementos nucleares cortos intercalados (SINES, forma siglada de *short interspersed nuclear elements*) y elementos nucleares largos intercalados (LINES, forma siglada de *long interspersed nuclear elements*) y retrovirus endógenos (RVE). La categorización de elementos repetitivos y las familias de elementos repetitivos, y sus secuencias de consenso de referencia, se definen en bases de datos públicas (por ejemplo, rebase (versión 12.09) - Instituto de Investigación en Información Genética (Jurka *et al.*, Cytogenet Genome Res 2005;110:462-7)).

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una molécula" incluye una pluralidad de tales moléculas y similares.

## Introducción

La presente divulgación está basada, en parte, en el descubrimiento de que los SNP que tienen una frecuencia alélica de 0,20 o mayor, a menudo de 0,30 o mayor, y preferentemente de 0,40 o mayor, por ejemplo, 0,44 o 0,45, o

mayor, se pueden estudiar en el ADN obtenido de un paciente trasplantado para identificar uno o más de tales SNP, que se pueden usar en el mismo como biomarcador para controlar el estado de rechazo del material de trasplante. Un biomarcador de SNP identificado en conformidad con la divulgación es uno para el cual el receptor del trasplante es homocigótico para el alelo y el material del donante tiene un alelo alternativo. Los métodos de la divulgación no precisan una muestra distinta del donante para identificar un biomarcador de SNP.

### Identificación de los SNP para detectar el rechazo del trasplante

Un SNP para su uso en la determinación de un biomarcador de trasplante en conformidad con la divulgación tiene una frecuencia del alelo menos común de al menos 0,20 o 0,30, y normalmente tiene una frecuencia del alelo menos común de al menos 0,40, 0,41, 0,42, 0,43, 0,44 o 0,45, o mayor. Además, tal SNP no está contenido dentro o no es directamente adyacente a un elemento repetitivo. Un SNP que no está contenido dentro o no es directamente adyacente a un elemento repetitivo" como se usa en este caso, significa que el SNP está suficientemente apartado de las secuencias repetitivas, de forma que se puedan diseñar cebadores que amplifiquen específicamente la región diana que contiene el SNP. Por ejemplo, un SNP que no es directamente adyacente a un elemento repetitivo puede estar a una distancia de 50 pares de bases o más, cadena arriba o cadena abajo de un elemento repetitivo.

La Tabla 1 proporciona los SNP ilustrativos para su uso en la divulgación. Los SNP se identificaron a partir de bases de datos públicas (por ejemplo, los sitios de internet hapmap.ncbi.nlm.nih.gov o www.1000genomes.org). También se pueden encontrar compilaciones para las matrices de SNP disponibles, por ejemplo, en el sitio de internet de Illumina para los SNP utilizados en el chip de SNP "HumanOmin5M". Como aprecia un experto en la materia, los SNP alternativos se pueden identificar basándose en estos criterios.

La frecuencia alélica puede variar dentro de distintas poblaciones. Por ejemplo, la frecuencia alélica puede ser distinta en una población de raza blanca, tal como una población de raza blanca del norte de Europa, en comparación con una población asiática, tal como una población japonesa. Por consiguiente, la determinación de un SNP adecuado para su uso para identificar un biomarcador de SNP de trasplante como se describe en el presente documento también puede tener en cuenta la información del acervo genético del receptor del trasplante y del donante con respecto a la frecuencia del alelo menos común.

En aspectos típicos, se identifica en una muestra obtenida del paciente trasplantado un SNP que se puede usar como un biomarcador de donante, sin emplear una muestra distinta de un donante. Por lo tanto, se puede usar ADN de un paciente para identificar un biomarcador de SNP para el trasplante de tejido de un donante. La muestra del paciente se puede obtener en cualquier momento dado después del trasplante para evaluar los SNP del donante.

### Detección de alelos de SNP alternativos del donante en el ADN

En un aspecto, se puede evaluar una muestra de sangre, por ejemplo, una muestra de suero o plasma, de un paciente en un marco de tiempo posterior después del trasplante, normalmente al menos cinco días después del trasplante, para determinar un SNP que pueda servir como biomarcador para el trasplante. En ese momento, habitualmente está presente en el ADN de un receptor de trasplante menos del 10 % del ADN de injerto. En este aspecto, para aislar el ADN se utiliza una muestra de sangre del receptor. El ADN se somete después a una etapa de amplificación para generar una biblioteca de ADN. Esta etapa de amplificación inicial para obtener la biblioteca de ADN también se denomina en el presente documento una "preamplificación". Para generar la biblioteca de ADN se puede usar cualquier método de amplificación, incluyendo, pero sin limitación, PCR. Los métodos de amplificación adicionales se describen a continuación. El número de ciclos de amplificación para esta etapa de preamplificación es suficiente para obtener una cantidad de biblioteca de ADN que se pueda evaluar para identificar un SNP de un donante. Como ejemplo ilustrativo, no limitante, se pueden realizar de 8 a 12 ciclos, aunque también se pueden realizar otro número de ciclos. Después, el ADN se evalúa en cuanto a los SNP preseleccionados que pueden servir como biomarcadores, utilizando los cebadores y sondas que amplifican las regiones diana que contienen los SNP que se identificaron como homocigóticos en el receptor. Este análisis se realiza mediante una PCR digital. Los SNP que proporcionan una señal para un alelo de SNP que no se identificó en el receptor se seleccionan como un biomarcador de trasplante para ese paciente trasplantado. Se observarán dos grupos de porcentajes: el que es dos veces más alto que el otro, por ejemplo, el 2 % frente al 1 % es homocigótico en el material de trasplante del donante, mientras que el porcentaje más bajo indica que el SNP es heterocigótico en el material del donante. Los SNP homocigóticos se utilizan preferentemente para todas las otras muestras del paciente. También se pueden emplear los SNP heterocigóticos, pero son menos sensibles.

Se puede utilizar cualquier método para determinar los SNP que son homocigóticos en el receptor del trasplante, incluyendo la hibridación en matriz, PCR cuantitativa, secuenciación o un método alternativo. En algunos casos, el genotipo de SNP del receptor para los SNP que tienen una frecuencia del alelo menos común de 0,20 o mayor, o de 0,30 o mayor, o preferentemente de 0,40 o mayor, en conformidad con la divulgación, se determina utilizando una biblioteca de ADN preamplificada como se describe anteriormente. En otros casos, el perfil de SNP del receptor del trasplante se realiza utilizando el ADN obtenido de leucocitos de sangre periférica o de otra muestra del paciente que está exenta de células del donante. La evaluación del perfil de SNP del receptor utilizando la biblioteca de ADN preamplificada puede emplear, pero sin limitación, una técnica que no es tan sensible como la PCR digital para

identificar los alelos de SNP del receptor. Los SNP que son homocigóticos en el paciente se utilizan en el análisis de la biblioteca de ADN para los alelos de SNP del donante, como se describió anteriormente.

5 En algunos aspectos, se utilizan sondas y cebadores para SNP que se dirigen a uno o más de los SNP identificados en la Tabla 1, por ejemplo, 10, 20 o 30, o más, de los SNP identificados en la Tabla 1, para determinar los SNP que son homocigóticos en el paciente. En algunos aspectos, se emplea una sonda de SNP que tiene una secuencia mostrada en la Tabla 1.

10 En algunos aspectos, el perfil de SNP para el material de trasplante del donante se puede determinar utilizando el ADN aislado de una muestra obtenida temprano después del trasplante, donde gran parte del ADN, por ejemplo, la mayoría del ADN, procede del injerto. En este aspecto, los biomarcadores de SNP se identifican utilizando una muestra de sangre obtenida del receptor, normalmente menos de un día después del trasplante. El ADN aislado de la muestra se preamplifica como se describe anteriormente para obtener una biblioteca de cf. Los SNP que son homocigóticos en el injerto se detectan mediante PCR en tiempo real o por un método alternativo que no precise  
15 PCR digital, aunque también se puede emplear PCR digital. Los SNP homocigóticos se determinan en el receptor. Por ejemplo, se aísla ADN de una muestra del receptor, por ejemplo, una muestra de LSP, y se utiliza para determinar los SNP que son homocigóticos. Para evaluar al receptor en cuanto a los alelos de SNP homocigóticos se puede usar cualquier método, incluyendo PCR en tiempo real, una matriz de SNP y similares. Después, se seleccionan los SNP donde el receptor y el material de trasplante, es decir, el donante, son homocigóticos, pero  
20 tienen alelos distintos para el SNP. Estos SNP se pueden usar como biomarcadores para futuras mediciones para evaluar el estado del trasplante. En algunos aspectos, se utilizan sondas y cebadores para SNP que se dirigen a uno o más de los SNP identificados en la Tabla 1, por ejemplo, 10, 20 o 30, o más, de los SNP identificados en la Tabla 1, para determinar los SNP que son homocigóticos en el paciente. En algunos aspectos, se emplea una sonda de SNP que tiene una secuencia mostrada en la Tabla 1.

25 Como aprecia un experto en la materia, cuando se utiliza ADN para identificar los alelos de SNP del donante para que sirvan como biomarcadores, el perfil de SNP del receptor normalmente se determina en primer lugar, de forma que solo se examinan en la muestra de ADN los SNP que son homocigóticos en el trasplante. Sin embargo, estas etapas no necesitan realizarse en este orden. Por ejemplo, los SNP se pueden evaluar en las diversas muestras en reacciones realizadas de forma simultánea.  
30

Los SNP también pueden identificarse para su uso como un biomarcador cuando estén disponibles tanto muestras del paciente como material genético del donante. En este caso, el ADN aislado de las muestras del receptor del trasplante y del donante se evalúan en cuanto a los SNP donde la frecuencia del alelo menos común es de 0,20 o  
35 más alta, normalmente de 0,30 o más alta, y preferentemente de 0,40 o más alta. En algunos casos, se determinan los perfiles de SNP de las muestras del paciente y del donante para al menos 10, 20, 30 o 40 de los SNP identificados en la Tabla 1. En algunos casos, la evaluación de SNP puede emplear una o más sondas que tienen una secuencia como se muestra en la Tabla 1. Los SNP donde el material y el receptor del trasplante son homocigóticos, pero con distintos alelos, se pueden usar después para la determinación futura del porcentaje de injerto de ADN.  
40

#### Amplificación de ADN

45 Las reacciones de amplificación se realizan en el ADN obtenido de muestras de ácido nucleico aisladas de diversas fuentes de receptores o donantes. Para la evaluación de muestras donde se desea tener presentes en la muestra solo células del receptor o el donantes, se utilizan convenientemente leucocitos de sangre periférica; sin embargo, se puede emplear cualquier otra muestra del receptor o del donante. Las reacciones de preamplificación o las reacciones de amplificación que no precisen la sensibilidad de la PCR digital se pueden realizar utilizando cualquiera de varias técnicas de amplificación muy conocidas.  
50

Las referencias ejemplares incluyen manuales tales como Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, 1994-1999, incluyendo actualizaciones suplementarias hasta 2013; Sambrook y Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª Ed, 2001). Aunque los métodos normalmente emplean etapas de PCR, también se pueden usar otros protocolos de amplificación. Los métodos de amplificación adecuados incluyen la reacción en cadena de la ligasa (véase, por ejemplo, Wu y Wallace, Genomics 4:560-569, 1988); el ensayo de desplazamiento de cadena (véase, por ejemplo, Walker *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392-396, 1992; Patente de los Estados Unidos n.º 5.455.166); y varios sistemas de amplificación basados en transcripción, incluyendo los métodos descritos en las patentes de Estados Unidos n.º 5.437.990; 5.409.818; y 5.399.491; el sistema de amplificación basado en transcripción (TAS) (Kwoh *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177, 1989); y replicación de secuencia autosostenida (3SR) (Guatelli *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878, 1990; el documento WO 92/08800).  
60 Como alternativa, se pueden usar métodos que amplifican la sonda hasta niveles detectables, tal como la amplificación por Q $\beta$ -replicasa (Kramer y Lizardi, Nature 339:401-402, 1989; Lomeli *et al.*, Clin. Chem. 35:1826-1831, 1989). En algunos aspectos, el ADN se amplifica utilizando ligamiento de adaptadores y la PCR de cebador único. Otros métodos de amplificación disponibles, tales como la PCR equilibrada (Makrigiorgos, *et al.*, Nature Biotechnol, 20:936-9 (2002)) y métodos de amplificación isotérmica, tales como la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) y la replicación de secuencia autosostenida (Guatelli *et al.*, PNAS USA  
65



87:1874 (1990)). En algunos aspectos, se pueden realizar reacciones combinadas en las que se amplifican y detectan múltiples regiones diana en una única reacción.

#### PCR digital

5 La PCR digital es una técnica en la que se realiza una dilución limitante de la muestra a través de un gran número de reacciones de PCR separadas, de forma que la mayoría de las reacciones no tienen moléculas de molde y proporcionan un resultado de amplificación negativo. Las reacciones que son positivas en el punto final de la reacción se recuentan como moléculas de molde individuales presentes en la muestra original en una relación de 1 a 1. (Véase, por ejemplo, Kalina *et al.* NAR 25:1999-2004 (1997) y Vogelstein y Kinzler, PNAS 96:9236-9241 (1999); patentes de Estados Unidos 6.440.706, 6.753.147 y 7.824.889). Se asume la partición cuantitativa y el intervalo analítico se rige por el número de recipientes disponibles para la separación estocástica. Después, las moléculas se detectan por PCR y se cuenta el número de recipientes positivos. Cada amplificación satisfactoria se cuenta como una molécula, independientemente de la cantidad real de producto. En algunos aspectos, una PCR digital puede ser una PCR digital basada en microfluidos. En algunos aspectos, se puede emplear una PCR digital en gotitas.

20 Un experto en la técnica puede diseñar fácilmente los cebadores y sondas para dirigirse a las regiones de un SNP de interés. Como se describe anteriormente, un SNP que se evalúa como un posible biomarcador de trasplante en conformidad con la divulgación tiene una frecuencia del alelo menos común de al menos 0,20 o al menos 0,30, y preferentemente de al menos 0,40, 0,41, 0,42, 0,43, 0,44 o 0,45, o mayor. Dichos cebadores y sondas se utilizan para detectar alelos de SNP individuales.

25 En algunos aspectos, se pueden usar métodos de amplificación específicos de SNP (por ejemplo, utilizando cebadores de amplificación específicos de SNP). En algunos aspectos, se utilizan los cebadores para amplificar una región diana y los alelos de SNP se detectan utilizando sondas específicas para cada alelo. Los oligonucleótidos que se emplean como cebadores y/o sondas para detectar biomarcadores pueden seleccionarse utilizando métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, los cebadores de PCR pueden diseñarse utilizando técnicas convencionales de programas informáticos para el diseño de cebadores conocidas por los expertos en la materia. Las variables consideradas durante el diseño de cebadores de PCR pueden incluir la longitud del cebador, el contenido en pares GC, la temperatura de fusión y el tamaño del ácido nucleico diana amplificado por la pareja de cebadores.

35 En un aspecto, el biomarcador se identifica por hibridación en condiciones de hibridación específicas de secuencia con una sonda que se dirige a la región del biomarcador (por ejemplo, se dirige a alguna porción asignada de forma inequívoca del biomarcador diana), con o sin una amplificación anterior de ADN. Los principios para diseñar tal sonda son muy conocidos en la técnica.

#### Uso de biomarcadores de trasplantes

40 Se puede usar un biomarcador de trasplante de SNP identificado en conformidad con la divulgación para evaluar el estado de rechazo del trasplante en el receptor. Dicha evaluación puede realizarse, por ejemplo, usando una reacción de amplificación para detectar el biomarcador de trasplante en el ADN presente en una muestra de sangre del paciente. El ADN del paciente puede evaluarse periódicamente, por ejemplo, en el transcurso de días, semanas, meses o años, en cuanto a los biomarcadores de SNP en ADN para controlar el estado del trasplante, es decir, si hay signos de rechazo o daño. Si el porcentaje de ADN de injerto aumenta más que la media, generalmente + 2DT de los valores observados en evoluciones sin complicaciones, o muestra un aumento sostenido, es indicativo de un rechazo.

50 Para detectar la presencia del biomarcador de trasplante, se obtiene una muestra de sangre del paciente en el punto de tiempo deseado después del trasplante. Se obtiene una muestra de ADN de la muestra de sangre y se analiza para determinar el nivel de material del donante identificando la presencia de alelos de SNP del donante en el ADN. Para evaluar la muestra se puede utilizar cualquier método. En aspectos típicos, se emplea PCR digital, tal como PCR digital basada en microfluidos o PCR basada en gotitas. Otros métodos pueden basarse en la hibridación directa de las sondas de detección (sin amplificación previa) o la secuenciación, por ejemplo, secuenciación de un amplicón definido en la Tabla 1. Por ejemplo, la región de SNP se amplifica por PCR y, después, el porcentaje del alelo menos común se determina por secuenciación del amplicón. Se puede determinar el porcentaje de ADN del donante (también denominado ADN de injerto) en la muestra de ADN. En otros aspectos, se determina el número de copia del ADN del donante.

60 El análisis de los niveles de ADN de injerto en la sangre usando un análisis de SNP como se describe en el presente documento se puede usar para detectar cualquier tipo de lesión o deterioro de las células de los órganos trasplantados. Por ejemplo, el análisis de ADN de injerto puede usarse para evaluar la lesión por perfusión. Normalmente, el control del ADN de injerto para determinar la presencia de lesión por reperfusión comprende controlar las muestras de ADN del receptor del trasplante que se obtienen poco después del trasplante, por ejemplo, en el espacio de 7 días desde el trasplante. En el contexto de la presente divulgación, el término "perfusión" se usa indistintamente con "reperfusión".

En algunos aspectos, el daño que surge de la reactivación de una infección vírica, por ejemplo, una infección por virus de la hepatitis, se puede evaluar utilizando un ensayo de SNP de ADNe de injerto en conformidad con la divulgación. En algunos aspectos, tales métodos comprenden además la identificación de la presencia del virus, por ejemplo, cuando el trasplante es un hígado, la presencia de un virus de la hepatitis.

5 En algunos aspectos, la evaluación del ADNe de injerto en un receptor de trasplante utilizando los métodos descritos en el presente documento se emplea para controlar el estado de un órgano de donante que es un órgano subóptimo. "Órgano subóptimo" es un término reconocido en la técnica que describe un órgano procedente de un donante que  
10 tiene antecedentes médicos que no cumplen con los antecedentes óptimos para donantes de órganos, por ejemplo, el donante, puede tener uno de los siguientes criterios: extremos de edad, antecedentes médicos personales adversos, etc. Estos criterios varían de un órgano a otro y dependen de los antecedentes médicos del paciente.

En algunos aspectos, el análisis de SNP del ADNe de injerto en conformidad con la divulgación puede usarse para  
15 ajustar una pauta de administración de un inmunodepresor en un paciente. Por ejemplo, se puede determinar la cantidad eficaz más baja de una farmacoterapia con un inmunodepresor que logre un nivel de ADNe de injerto que se observa en pacientes con trasplante estables. Normalmente, el control del estado del injerto para ajustar una pauta de administración de un inmunosupresor comprende controlar las muestras de ADNe del receptor del trasplante que se obtienen aproximadamente a los diez días o dos semanas, o más. El control se puede realizar durante un período de tiempo prolongado de hasta años con los intervalos deseados.

20 En algunos aspectos, el análisis del ADNe de injerto en conformidad con la divulgación se puede usar para detectar una lesión en un trasplante de órgano sólido provocada por anticuerpos específicos de donante. Un receptor de trasplante puede controlarse en el transcurso de años en cuanto a tal daño. En algunos aspectos, un método de la divulgación puede comprender además detectar la presencia de anticuerpos específicos de donante en circulación  
25 en la sangre del receptor del trasplante. Dichos anticuerpos son específicos para el tipo de HLA del órgano del donante y pueden detectarse usando ensayos conocidos. En algunos aspectos, un paciente que tiene tales anticuerpos específicos para el donante puede tratarse adicionalmente con agentes inmunodepresores que inhiben a los linfocitos B.

30 La información obtenida del análisis de biomarcadores de SNP se puede almacenar en una forma legible por ordenador. Dicho sistema informático normalmente comprende los subsistemas principales, tales como un procesador central, una memoria de sistema (generalmente RAM), un controlador de entrada/salida (E/S), un dispositivo externo tal como una pantalla de visualización a través de un adaptador de pantalla, puertos serie, un teclado, una unidad de disco fija a través de una interfaz de almacenamiento y una unidad de disquete operativa  
35 para recibir un disquete, y un dispositivo de CD-ROM (o DVD-ROM) operativo para recibir un CD-ROM. Se pueden conectar muchos otros dispositivos, tal como una interfaz de red conectada a través de un puerto serie.

El sistema informático también puede estar vinculado a una red, que comprenda una pluralidad de dispositivos informáticos vinculados a través de un enlace de datos, tal como un cable Ethernet (coaxial o 10BaseT), línea telefónica, línea ISDN, red inalámbrica, fibra óptica u otro medio de transmisión de señales adecuado, mediante lo  
40 cual al menos un dispositivo de red (por ejemplo, ordenador, conjunto de discos, etc.) comprende un patrón de dominios magnéticos (por ejemplo, disco magnético) y/o dominios de carga (por ejemplo, una matriz de celdas DRAM) que componen un patrón de bits que codifican datos adquiridos a partir de un ensayo de la divulgación.

45 El sistema informático puede comprender un código para interpretar los resultados de un estudio para determinar biomarcadores de trasplante de SNP o para evaluar la presencia de uno o más de los biomarcadores de trasplante de SNP, identificados en conformidad con la divulgación para ayudar en el pronóstico. Por lo tanto, en un aspecto ejemplar, los resultados del análisis de biomarcadores se proporcionan a un ordenador donde un procesador central ejecuta un programa informático para evaluar uno o más biomarcadores.

50 En el presente documento se divulga el uso de sistema informático, tal como el que se describe anteriormente, que comprende: (1) un ordenador; (2) un patrón de bits almacenado que codifica los resultados de las pruebas de biomarcadores obtenidas por los métodos de la divulgación, que puede almacenarse en el ordenador; (3) y, opcionalmente, (4) un programa para evaluar un biomarcador.

55 También se divulgan métodos para generar un informe basado en la detección de uno o biomarcadores de trasplante de SNP para el paciente.

60 Además, se divulgan sistemas relacionados con los métodos anteriores. En un aspecto la divulgación proporciona un sistema para analizar ADN extracelular en circulación, que comprende: (1) un analizador de muestras para ejecutar el método de análisis de ADN extracelular en circulación en la sangre, el suero o el plasma de un paciente como se describe en los diversos aspectos anteriores; (2) un sistema informático para recibir y analizar automáticamente los datos obtenidos en la etapa (1), para proporcionar un valor de prueba que represente el estado (presencia o ausencia, o cantidad, es decir, la concentración o el número de copia) de un biomarcador de trasplante de SNP para  
65 el paciente.

La función de análisis basada en ordenador se puede implementar en cualquier lenguaje y/o exploradores adecuados. Por ejemplo, puede implementarse con lenguaje C y, preferentemente, utilizando lenguajes de programación de alto nivel orientados a objetos, tal como Visual Basic, SmallTalk, C++ y similares. La aplicación se puede escribir para adaptarse a entornos tales como el entorno de Microsoft Windows™, incluyendo Windows™ 8, Windows™ 7, Windows™ 98, Windows™ 2000, Windows™ NT y similares. Además, la aplicación también puede escribirse para entorno MacIntosh™, SUN™, UNIX o LINUX. Además, las etapas funcionales también se pueden implementar utilizando un lenguaje de programación universal o independiente de una plataforma. Los ejemplos de tales lenguajes de programación multiplataforma incluyen, pero sin limitación, lenguaje de marcado de hipertexto (HTML), JAVA™, JavaScript™, lenguaje de programación Flash, interfaz común de pasarela/lenguaje de consulta estructurada (CGI/SQL), lenguaje práctico de extracción e informes (PERL), AppleScript™ y otros lenguajes de *script* del sistema, lenguaje de programación/lenguaje de consulta estructurado (PL/SQL) y similares. Se pueden utilizar navegadores habilitados con Java™- o JavaScript™- tales como HotJava™ o Microsoft™ Explorer™. Cuando se usan páginas de internet de contenido activo, pueden incluir *applets* de Java™ o controles ActiveX™, u otras tecnologías de contenido activo.

La función de análisis también puede incorporarse en productos de programas informáticos y utilizarse en los sistemas descritos anteriormente, u otros sistemas informáticos o basados en internet. Por consiguiente, otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un producto de programa informático que comprende un medio utilizable por ordenador que tiene códigos de programa legibles por ordenador o instrucciones incorporadas en el, para permitir que un procesador lleve a cabo las funciones de análisis y correlación como se describe anteriormente. Estas instrucciones de programa informático se pueden cargar en un ordenador u otro aparato programable para producir una máquina, de forma que las instrucciones que se ejecutan en el ordenador u otro aparato programable creen medios para implementar las funciones o etapas descritos anteriormente. Estas instrucciones de programa informático también pueden almacenarse en una memoria o medio legible por ordenador que puede dirigir un ordenador u otro aparato programable para que funcione de una manera en particular, de forma que las instrucciones almacenadas en la memoria o el medio legible por ordenador produzcan un artículo de fabricación que incluye medios de instrucción que implementen el análisis. Las instrucciones del programa informático también se pueden cargar en un ordenador u otro aparato programable para provocar que se realice una serie de etapas operativas en el ordenador u otro aparato programable, para producir un proceso implementado en el ordenador de forma que las instrucciones que se ejecutan en el ordenador u otro aparato programable proporcionen etapas para implementar las funciones o etapas descritas anteriormente.

Los siguientes ejemplos se proporcionan solo como ilustración y no como limitación. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Cuantificación de ADN extracelular del donante

#### Métodos

##### Ensayos de SNP

Los SNP se seleccionaron de las bases de datos públicas considerando los que muestran una frecuencia del alelo menos común conocida y validada de >40 % en los individuos de raza blanca y >45 % en todas las etnias informadas. Como siguiente etapa, se eliminaron los SNP que están en, o son directamente adyacentes a, un elemento repetitivo. Después, se investigaron los SNP restantes en cuanto a su utilidad en un ensayo de hidrólisis de sonda. Esto se hizo *in silico* usando cálculos termodinámicos (Schütz y von Ahsen, *Biotechniques* 27:1218-1222, 1224, 1999) para optimizar las diferencias de unión para las dos sondas que hibridan con los dos alelos a la temperatura deseada de 65 °C en condiciones convencionales de tampón de PCR (por ejemplo, sal 0,18 mol/l y ADN/cebador 0,5 µmol/l ). Debido a que la pendiente de una curva de fusión de la sonda de ADNbc depende principalmente de la entalpía de las sondas (Marky y Breslauer, *Biopolymers* 26:1601-1620, 1987), lo último domina la selección para una diferencia maximizada de la energía de libre Gibbs entre la unión de a alelos en una condición dada. Se diseñaron un total de 41 conjuntos de sondas (Tabla 1) con una sonda para cada uno de los dos alelos, en las que se utilizaron FAM y HEX junto con BHQ1 como extintor. Los respectivos cebadores de PCR se diseñaron para que presenten una Tm de 68 °C y una unión de > 95 % a 60 °C.

Cada uno de los ensayos se optimizó primero en un LightCycler480, utilizando ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad) y, posteriormente, se optimizó para PCR digital de gotitas (PCRDg), que dio lugar a condiciones de ciclado ligeramente distintas. Se establecieron dos temperaturas de hibridación distintas para maximizar la eficacia y la diferenciación de los alelos.

La Tabla 1 enumera las sondas y otras características para cada uno de los SNP seleccionados. Tabla 1 parte A: col. 1, denominación de SNP en la Tabla 1; col. 2, nombre/ referencia de SNP; col. 3, cromosoma; col. 4, posición en el cromosoma; col. 5, frecuencia del alelo menos común (MAF) (todas las poblaciones); col. 5, MAF, raza blanca;

## ES 2 704 682 T3

col. 6 y 7: cebadores ilustrativos para la amplificación de la región diana que contiene SNP; col. 8, temperaturas de hibridación y extensión. Tabla 1 parte B: col. 1, denominación de SNP en la Tabla 1; col. 2, SNP (cambio de nucleótido); col. 3, longitud del amplicón que contiene SNP obtenido con los cebadores mostrados en la parte A, col. 6 y 7; col. 4-7, Sondas y características de SNP.

5

Tabla 1-parte A

Nombre corto	Nombre	Cromo s.	Pos. (Mb)	MAF (todas)	MAF (Raza blanca)	Cebador directo	Cebador inverso	Hibridación y extensión °C
S43	GA002729	2	217,6	47,1 %	47,1 %	gtctcgggggtctgttgccc	agaggaaggactccaggggg	61
S46	kgp2846187	16	13,3	49,1 %	49,1 %	tcacagagagaaatagctcgc	agccaccctggctctcttca	59
S38	kgp3586059	10	71,6	48,6 %	48,6 %	tcaatctcacaactccctaaggg	agtggaggggaggtacagtga	61
S48	kgp3469073	16	87,7	48,8 %	48,8 %	gggggtgggggtgaggga	gcgggcgtgggggtgltta	61
S50	kgp5728993	1	4,8	48,5 %	48,5 %	tcctcagagcgtccctgaaagg	acagagccggccggctcgc	61
S51	kgp7257211	15	96,7	48,8 %	48,8 %	ctgaccaatgtgtgtagagca	tcctgagcactaccagcctcaca	61
S53	kgp779610	8	104,2	48,7 %	48,7 %	tgggcagctcactgagca	acccccctgtgctctgct	59
S54	kgp8186648	7	7,8	49,4 %	49,4 %	actgccccctagaacaactgct	gcagctactatagaacaacatggcgc	59
S55	kgp9738136	18	3,8	49,7 %	49,7 %	cgccccaaattcgccacaacca	acttcccccaacccccact	61
S57	rs2523860	6	31	49,9 %	49,9 %	cagctcigtctccaggct	ggagaalcccagaagcaggctga	59
S58	kgp10934323	2	47,9	49,9 %	49,9 %	gtgcagccccctgtctatgct	catgccaggccagggtgg	59
S59	kgp12078903	8	20,8	48,7 %	48,7 %	agaaagaagaagcagggaggac	tgagctaaatagaccctgct	61
S63	kgp5942754	7	153,1	49,3 %	49,3 %	gcgtgtcctcaccaggt	agggcaaggcaaaagcaca	61
S66	kgp7251638	11	80,8	50,0 %	50,0 %	accctgaccctcagttcctt	aagagcccttaagggtgtagaaa	61
S67	kgp7882745	19	30,1	43,5 %	43,5 %	algaagaglaagggggccg	cggaccctttaccacca	61
S68	kgp6436409	8	105,4	46,7 %	46,7 %	ggacactcactgggcccct	aggactgaactagaagaaaagctgg	59
S70	rs6436409	2	224,4	49,1 %	49,1 %	tgcccccttagaaggctgga	cggccccctatctggagat	61
S77	rs2072042	16	1	49,7 %	49,7 %	gggctcagctctagacgagt	gtttccgtgaaagtaggct	61
S78	kgp12502655	7	55	49,1 %	49,1 %	aggcagaactaaactgtgctt	tgcggaacagtgcacaattgttc	59
S79	rs11103106	9	138,5	49,7 %	49,7 %	caggagtgctttactgaggca	actaaacacagggagctggc	59
S80	kgp3747074	6	35,7	50,0 %	50,0 %	aactagctcctctgctcagt	gtacccttaactcagtagatct	61
S82	rs10228737	7	4,2	49,7 %	49,7 %	ttgcacttgaccaccaccg	ccgagggcagaggaaaggaagtg	61
S83	rs13317873	3	150,9	49,7 %	49,7 %	ggtttctctgtagatccctct	agcattgtagggactggtaaat	61
S84	rs10164176	18	44,8	49,3 %	49,3 %	ccccaaactaagtaacctacactct	cccaagggagcattccaccat	61
S85	rs251022	5	140,9	49,9 %	49,9 %	acacacacacagcaaitcgg	atgagctgaggtgggtgctg	61
S86	rs12096438	1	25,9	50,0 %	50,0 %	gtctccctccccaaaggctc	gccaacctcaaggggcagtt	59
S87	rs10734083	10	131	49,9 %	49,9 %	ggcacttgaattcaagcttggatc	tictctagttggtctggtaggct	61
S88	kgp187715	19	41,1	49,7 %	49,7 %	tggttatttactaggtcccacc	agaataagcaagatgtggcagtgag	61
S90	kgp5357482	22	25,5	49,6 %	49,6 %	tggtgaacgtcccagaagga	caagcacacgtgctgctc	59
S91	rs2298065	X	44	49,6 %	49,6 %	gcagaggaagaagaagagga	gcagtagataactcgttccagc	59
S92	kgp5971873	5	149,6	48,8 %	48,8 %	gtgagcagaatccaagctcagc	ccccccctataaacaacctc	61
S94	rs7072759	10	18,6	49,1 %	49,1 %	ctggggcagagtgagagatc	atccaccctgaaccagacc	61
S96	kgp5873854	15	70,7	49,7 %	49,7 %	tcccaggctcccaggctcagat	ggatcactgtggctgctccct	61
S97	kgp9771053	18	8,6	49,6 %	49,6 %	agccctgcacactcaactacc	tggcattcagatcattcaggctct	59
S99	rs12064796	1	20,1	49,6 %	49,6 %	ggcaagtgggcaagggctct	gctctcctaaagctgagccaca	61
S102	kgp1474040	13	27,6	49,4 %	49,4 %	aacagtgccagccctctgt	acacttggtctatgggtgtg	59
S103	rs4632826	5	141,9	49,3 %	49,3 %	agcttctctgctctgccccca	gggtgcccattgcccagagat	61

Nombre corto	Nombre	Cromo s.	Pos. (Mb)	MAF (todas)	MAF (Raza blanca)	Cebador directo	Cebador inverso	Hibridación y extensión °C
S105	rs1265094	6	31,1	49,1%	49,1%	accccaagaggciffatagggg	ccfccccaaagggttigacc	61
S107	kgp4246032	9	28	49,9%	49,9%	cttcccttgccccctfcca	tgctctggtgatccclggag	59
S108	rs11610836	12	113,2	49,0%	49,0%	acactcctgtgctgtctg	ttctccccaccactcccat	61
S110	rs13185616	5	13,7	49,7%	49,7%	ggtctaccgagggtgggtga	catgccaaggacagagggaga	61

Tabla 1-B

Nombre corto	SNP	Longitud del amplicón (pb)	Sonda_A*	Sonda_B*	ΔG-Alelo coincidente**		ΔG-Alelo no coincidente**	
					SondaA	SondaB	SondaA	SondaB
S43	C>G	100	tgagacagggctccgCagag	tgacacagggctctCcg	-1,19	-1,57	2,33	1,54
S46	C>G	90	ctggagagaaagaacaacaCagcat	cafttcccaaatgtCttgtct	-0,08	-0,19	3,61	3,25
S38	C>G	90	aaaaggggtgggtCaatgic	aggadgacattCacaccacc	-0,04	-0,80	2,59	1,83
S48	C>G	91	cggagaccctggCtttg	ttccatgacaaaCcgacagg	-1,59	-0,09	2,74	4,08
S50	C>G	91	cggtttgcctcCgltgaa	agtcatttcacgCgagcg	-0,32	-0,30	3,74	4,18
S51	C>G	106	ctttagcgcacaagaagatCagag	agaatgigtctcaactCcatct	-0,63	-0,66	2,00	1,96
S53	C>G	107	aggCctgggtggagaagt	ccagCctgtctcaaaagcc	-0,42	-0,13	3,58	3,87
S54	C>G	171	atgaaccaagcagtaCtgggaat	accaaaaattccacaCtactgct	-0,13	-0,17	4,38	4,33
S55	C>G	98	acttcagcaacagCctgga	ctctgaaattccacagCctgt	-0,52	-0,44	3,48	3,56
S57	C>G	107	cactcaagttggatactCgttc	cccagtaaggaatggagaaacCaafta	-0,14	-0,26	3,45	3,32
S58	C>G	87	attacaggtcagCcacgg	caaggcaaggCctcat	-0,40	-0,06	3,60	3,94
S59	C>G	92	attacatagcttataCtgcagagcc	actcctgctctgcaaCtgat	-0,08	-0,24	4,42	4,26
S63	C>G	103	aactggaaatcaacCtgcacca	ctgactcttggtaCgtgt	-0,42	-0,17	3,97	4,48
S66	C>G	98	aggatafctagagtgagCagaac	accactgatttggctCactccact	-0,13	-0,82	2,50	1,81
S67	C>G	86	cccgaccctaacCtcccc	tgagaggggtggggaCgfta	-0,12	-0,39	4,27	4,26
S68	C>G	105	agacaCttgggactcagaagg	aaaaCtctctctgtctct	-0,49	-0,43	4,01	4,07
S70	C>G	97	accctctactgCgcac	acagtgaagggtgcccaggt	-0,66	-0,60	3,82	3,47
S77	T>C	96	atgctcagcacacAagggga	cactgctccccCgtgig	-0,18	-0,03	2,80	4,10
S78	A>G	88	atgcAgtcttggatgaggt	atgcccagaagcCgatafttctct	-0,29	-0,54	2,68	3,58
S79	A>G	98	ggcagcaggtgcccAagca	aggcaattactctCggcacc	-0,17	-1,12	2,47	2,40
S80	A>G	96	cccagcaggaagcagAgtc	agtaagaatcagacCggcttcc	-0,53	-0,04	2,06	3,70
S82	T>C	79	tgcAalagagcagagggcd	calCgcagcccctcgcga	-0,04	-0,19	2,60	3,33
S83	T>C	116	atacActctgttggagtgccac	cagagCgtatgtaagtcagaggt	-0,02	-0,16	2,86	4,02
S84	T>C	96	ccccCgggaggaatgctttg	cccAgtgggactctggcc	-0,69	-0,25	2,55	1,89
S85	A>G	94	acacaAgtggccctccg	acaGaglgccctccgat	-0,15	-0,24	2,15	2,34
S86	T>C	95	aggaaagaacccttcAgtgtcaggt	tgaggattaacctgacatCgaaaggt	-0,06	-0,31	2,92	3,81
S87	T>C	94	agcctgtacacCtcccc	acactgggagtgggggaAagt	-0,35	-0,61	2,56	1,69
S88	C>G	95	aggacittatgggagcCtgac	ciggaagcccaagtaCccctc	-0,76	-0,36	3,56	3,82
S90	A>C	89	cagTgcccctgcccaggaa	ggggcCctgctgagcatag	-0,49	-0,51	2,51	3,39
S91	A>C	96	ccctctcCccccaaattttagt	tggggTgaggaggactgga	-0,28	-0,03	3,62	2,98
S92	A>G	149	ccCgcagttgcacagcttg	actgcAgtcccacaaggtg	-0,71	-0,09	3,42	2,89
S94	A>G	83	aggacAclgacgctgig	cagCgtctctgigtctactc	-0,06	-0,50	2,82	3,69
S96	T>C	81	tctcCgccctctgagatgc	agggcAgagactctggaaact	-0,13	-0,19	3,99	2,79
S97	A>G	83	ccatcaggtgctgcccActc	tgcagggaagagCgcccag	-0,55	-0,28	2,33	3,91
S99	A>G	96	tggggccaGgtacctgg	tggggccaAgtacctggt	-0,31	-0,02	2,26	2,62
S102	C>G	80	tggcctatcttggcccctaaCag	aggcacatcttactCttagggc	-0,97	-0,58	2,72	2,85
S103	T>C	143	cccctggggccatcaGgtt	cccctggggccatcaAgttt	-1,22	-0,52	1,35	2,12

Nombre corto	SNP	Longitud del amplicón	Sonda A*	Sonda B*	$\Delta G$ -Alelo coincidente**	$\Delta G$ -Alelo no coincidente**
S105	A>G	96	ccactgggctggCccctc	agtgaggaggAccagc	-1,66	2,14
S107	T>C	76	aggttgigaaAgigccct	agcccicaggcacCtica	-0,32	2,52
S108	T>C	96	ggfccagctggtCgtgg	atgctccccacAaccagct	-0,70	2,81
S110	A>C	90	tttgtagggaaggaactcCcaat	atcagtggtccattgTgagttcc	-0,15	3,75



Muestras

Para el establecimiento y la optimización iniciales del ensayo, se extrajeron ADN genómico y ADNe de la sangre anticoagulada con EDTA extraída de voluntarios sanos. En el espacio de una hora después de la extracción, se separó el plasma de las células mediante centrifugación (2500 x g durante 10 min a 4 °C, seguido de una segunda centrifugación del plasma a 4000 x g durante 20 min a 4 °C para eliminar cualquier residuo celular). El ADN del plasma (>1 ml) y de la capa leucocitaria recogida se extrajo con el Kit de Extracción Total Viral Acid Extraction de Roche usando las instrucciones del fabricante. Los resultados informados en este caso eran de muestras que se extrajeron con un protocolo aprobado por el comité de ética con consentimiento informado.

Las muestras eran de pacientes de poco después (<4 meses) de un trasplante (hígado: LTx, n=6) o de pacientes ambulatorios estables durante el último curso de mantenimiento después del trasplante de hígado (LTx, n=9), corazón (HTx, n=8) y riñón (KTx, n=9).

Construcción de la biblioteca

Normalmente, se espera que estén presentes aproximadamente de 1.000 a 1.500 copias del genoma en un ml de sangre. La recuperación, si se utiliza 2 ml de plasma con EDTA, por lo tanto, es de aproximadamente 4.000 a 6.000 copias. Si el 2 % se detecta de manera cuantitativa, el número necesario de fragmentos para el análisis de varios SNP solo se puede conseguir si se realiza una preamplificación. Para este fin, los inventores usaron el kit NEBNext Ultra DNA Library Prep (New England Biolabs), dado que esto proporcionó la mejor eficacia en cantidades tan bajas como 5 ng de ADN, lo que refleja la cantidad habitual de ADNe, cuando las muestras se proporcionan como se indica anteriormente. Los inventores amplificaron el ADNe ligado hasta 1.100 ng en promedio (DT: 325) utilizando un máximo de 11 ciclos de PCR, utilizando control en tiempo real de la amplificación de la biblioteca en un LightCycler480 (Roche Applied Sciences).

PCR digital de gotitas

Las reacciones de PCRdg se prepararon utilizando la ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad). Cada reacción contenía 30 ng o 100 ng de la biblioteca de ADNe como molde, cada cebador 900 nmol/l y cada sonda 250 nmol/l. Las gotitas se generaron utilizando el generador de gotitas QX100 (Bio-Rad) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las condiciones de ciclado fueron: 95 °C durante 10 min, 50x(94 ° durante 30 s, 95 %/61 ° durante 1 min), 98 ° durante 10 min. Las gotitas se leyeron en el lector de gotitas QX100 y se analizaron utilizando el programa informático Quantasoft versión 1.3.2.0 (Bio-Rad). Para la cuantificación de la abundancia fraccionaria del alelo menos común, se utilizó el cálculo "Detección de eventos raros" autocontenido, que básicamente toma en cuenta la distribución de Poisson subyacente para calcular la concentración de la molécula de molde de cualquiera de los alelos. Después, estos valores se utilizan para expresar el alelo menos común en porcentaje de la concentración total.

**Resultados**Análisis

Los inventores investigaron en primer lugar qué tan sensibles eran los métodos en términos de los límites de detección de cantidades escasas de un alelo. Para ello, se mezclaron cantidades conocidas de los ADN genómicos con genotipos conocidos, por SNP, a una concentración del alelo menos común del 2%. La precisión intraensayo se determinó en series de 9 repeticiones en una serie para calcular un coeficiente de variación (CV). La Figura 1 ilustra los perfiles del CV para 13 de los ensayos de SNP. Se puede observar que incluso con un contenido de alelo menos común del 2 % se logró un CV de <15 % (amplitud 4 % -14 %), que es comparable al CV obtenible teórico basado en el número de gotitas positivas para el alelo menos común ( DT de 151: 54). Los CV informados fueron suficientes para el objetivo de detectar de ADN de injerto. La recuperación del 2 % añadido fue en promedio del 1,87 % (94 % del valor añadido) a los largo de los trece ensayos de SNP con una desviación típica del 0,24 % (13 %).

La Figura 2 ilustra un procedimiento implementado para determinar el contenido de ADN de injerto en la circulación de los receptores. Para seleccionar los SNP para cada receptor que proporcionen la mayor sensibilidad teórica, se analizó una muestra en cuanto a todos los SNP en una ejecución con LightCycler480. Los SNP heterocigóticos en el receptor se eliminaron de las PCRdg consecutivas. Si se analizaban múltiples muestras de un paciente, solo se usó una muestra para esta etapa de preselección. Esto produjo en promedio 17 (DT: 4) ensayos de SNP útiles para cada uno de los receptores analizados (n= 32).

Las PCRdg de las muestras clínicas se realizaron utilizando 30 ng (muestras de LTx) o 100 ng (muestras de HTx y KTx) de la biblioteca de ADNe por pocillo, lo que se tradujo en aproximadamente 0,5 y 1,5 copias por gotita, respectivamente. La Figura 3 muestra los resultados para receptores estables de trasplante de hígado, riñón y corazón sin signos de rechazo. Se realizaron un total de 10 ensayos distintos de PCRdg para los pacientes con LTx y un total de 16 ensayos distintos de PCRdg para los pacientes con KTx y HTx. El número de ensayos informativos utilizados para determinar el contenido de ADNe de injerto se proporciona debajo de la abscisa. El porcentaje de

ADN de injerto en la circulación de los receptores de hígado fue inferior al 10 % en todos los pacientes. La cantidad promedio de ADN de injerto fue del 3,7 % (DT: 2,9 %) en el grupo de LTx (n=10). Los contenidos de ADN de injerto promedio de KTx (n=9) y HTx (n=8) con el 1,2 % (DT: 1,2 %) y el 0,9 % (DT: 1,1 %) son menores. La mayor cantidad en LTx en comparación con los otros órganos puede reflejar la mayor tasa de regeneración que se observa habitualmente para los hepatocitos, en comparación con otras células, por ejemplo, células de corazón y riñón.

En la fase temprana (aguda) después del LTx, la cantidad detectada de ADNe de injerto fue muy distinta de la de la fase estable, reflejando muy probablemente el daño por isquemia/reperfusión y la recuperación de eso. Los inventores analizaron muestras en el espacio de 5 horas después de restablecer el flujo sanguíneo al órgano donado. La Figura 4 muestra el curso temporal del ADNe de injerto en este paciente, quien más tarde tuvo una excelente recuperación de la función del injerto. Durante la fase inicial posinjerto, el ADN de injerto fue la gran mayoría del ADNe (hasta > 95 %), pero después disminuyó con una semivida aproximada de 24 horas. Se siguieron cinco pacientes inmediatamente después del LTx. De estos, 3 no tuvieron complicaciones graves ni episodios de rechazo notificados durante los primeros 3 meses. Los ensayos totales de PCRdg realizados fueron 12 para LTx1, 16 para LTx3 y 18 para LTx6. Se utilizaron para determinar el contenido de ADNe de injerto los resultados de cinco ensayos informativos distintos. El porcentaje de ADNe de injerto siempre fue < 15 % desde el día 10 en adelante, si no se presentaban complicaciones.

Por el contrario, un paciente tuvo algunos episodios de supuesto rechazo temprano que se comprobaron mediante una biopsia en el día 42 después del LTx. Para este paciente se realizaron un total de 16 ensayos de PCRdg. Se promediaron cinco ensayos informativos distintos para obtener el contenido de ADNe de injerto. La Figura 5 presenta el curso temporal de los marcadores sensibles de rechazo bilirrubina y AST (aspartato aminotransferasa), utilizados habitualmente, junto con el porcentaje de ADNe de injerto en este paciente. Después de tener un valor inicial de ADNe de injerto de ~ 15 % en el día 7, los valores aumentaron y nunca volvieron a los valores observados en pacientes sin complicaciones durante todo el período de observación. Además, este porcentaje aumentó notablemente en el día 32, varios días antes de que los parámetros convencionales sugirieran un posible rechazo.

Este ejemplo ilustra, así, la identificación de los SNP para evaluar el estado del trasplante y demostró que hubo un aumento significativo del ADNe de injerto que precedió a los incrementos de AST y bilirrubina en un caso de rechazo de LTx. Por lo tanto, se desarrolló una técnica rentable que puede determinar cantidades relativas de ADN de injerto en ADNe de pacientes con LTx en un día de trabajo. Esta técnica hace del ADNe de injerto un biomarcador prometedor para la detección temprana del rechazo, potencialmente permitiendo una intervención terapéutica más a tiempo.

### 35 **Ejemplo 2. Análisis adicional de ADNe - Cuantificación de ADNei como copias/ml**

Cuando la proporción de ADNe de injerto con respecto al del hospedador tiene ventajas analíticas al eliminar variables molestas, tal como la eficacia de la extracción de ADN, las variabilidades en el ADNe del hospedador pueden hacer confusa la visión del órgano injertado. La fase inicial después del trasplante se utilizó como modelo para comparar el porcentaje o la concentración plasmática absoluta de ADNei, una medida más valiosa de la integridad del injerto.

#### ***Materiales y métodos***

45 Las muestras de sangre de pacientes después del trasplante de hígado (LTx), corazón (HTx) y riñón (KTx) se extrajeron de acuerdo con los protocolos aprobados por el comité de ética. Se incluyeron muestras (288) de 23 LTx para la evaluación de la potencia para medir los números de copias de ADNei en la fase inicial postoperatoria. Para las investigaciones de la extracción de ADNei, se utilizaron grupos de voluntarios normales.

50 Se extrajo sangre entera con EDTA y se procesó en el espacio de 4 horas. Para los pacientes con LTx, se utilizaron para un subconjunto de muestras tubos de ADNe (9 ml) de Streck Inc. La extracción de ADNe a partir de 1-2,5 ml de plasma se realizó usando el kit High Pure Viral Extraction Large Volume (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero sin la adición de ARN transportador.

55 Para la evaluación en el ensayo del rendimiento de extracción, se añadió a las muestras un ADN artificial (denominado "añadido" en el ejemplo) en una cantidad conocida. El añadido consistió en un ADN de 320 pb no procedente de ser humano que se clonó en un vector pGEM-T (Promega) y se produjo utilizando polimerasa Phusion (NEB) con cebadores de m13. El producto resultante se limpió utilizando la purificación AMPure XP (Beckman-Coulter) y se almacenó en una concentración de 1.400.000 veces la dilución del añadido final utilizada para la extracción. Antes de cada extracción, el añadido se diluyó y se agregaron 20 µl al plasma justo antes de agregar la proteasa y el tampón de unión. Esto dio como resultado una cantidad aproximada de 5.000 copias de añadido por ml de plasma.

65 Para la cuantificación de ADNe total, se usaron en PCRdg dos ensayos no específicos de SNP de genes de copia única junto con la cuantificación del patrón interno en un ensayo. Se diluyeron 20 µl de la dilución de añadido usada para la extracción respectiva hasta un volumen final de 50 µl usando tres veces de H<sub>2</sub>O y se midió cada dilución

independiente en PCRdg por duplicado. El ADNe se corrigió en cuanto a la eficacia basada en la longitud de la PCR de 98 pb y 90 pb, basándose en la distribución de tamaños publicada (Beck, *et al.* Clin Chem 55: 730-38, 2009). Se utilizó un segundo conjunto de cebadores de 223 pb y 224 pb que se dirigían a las mismas regiones genéticas para evaluar la presencia de fragmentos de ADN más largos en los extractos de ADNe. La proporción entre cop./ml determinada usando los ensayos de amplicón largo frente a los ensayos de amplicón corto se calculó como una medida del contenido de ADN necrótico. El ADNei se calculó multiplicando el ADNei [%] por el ADNe [cop./ml] dividido por la eficacia de extracción del patrón interno.

El ADNei [%] se midió como se describe (Beck *et al.*, Clin Chem 59: 1732-41, 2013) en un sistema QX100/200, que se usó para todos los otros ensayos de PCRdg descritos a lo largo del estudio.

### Resultados

Cuando se comparó el ADNei medido como copias/ml con los valores expresados como porcentaje, se observó una correlación de  $r=0,81$  en las muestras de pacientes con LTx desde el día 6 poscirugía en adelante. (Figura 6). El valor más cercano que sería comparable al delimitador del 10 % utilizado en los porcentajes se definió como de 3.000 cop./ml para pacientes con LTx desde el día 6 poscirugía en adelante.

### Ejemplo 4 - Uso del análisis de SNP de ADNei para optimizar la terapia inmunodepresora

La minimización de la inmunodepresión precisa herramientas para evaluar la exposición mínima necesaria en pacientes individuales. Las concentraciones del fármaco y los marcadores convencionales no son predictores precisos para este fin. Por lo tanto, en el presente estudio, se investigó un nuevo método práctico y rentable para la determinación del ADN extracelular procedente de injerto (ADNei), como un marcador sensible de la lesión del injerto después del trasplante de hígado (LTx).

Métodos: Se cuantificó el ADNei ( $n = 171$ ) usando el ensayo de PCR digital en gotitas en  $N=12$  pacientes adultos, predominantemente durante la fase inicial (días 8-30) después del LTx, para determinar la cantidad de ADN de injerto. Valores obtenidos en pacientes con diversas causas de disfunción del injerto (es decir, infección por hepatitis C [VHC+], colestasis, bajas concentraciones de tacrólimus y rechazo) se compararon con un valor de corte publicado (10 %) de un grupo de control histórico ( $N=10$ ) de pacientes adultos con LTx estables sin ninguna indicación clínica o de laboratorio de disfunción o rechazo del injerto.

Los resultados mostraron que los niveles de tacrólimus subterapéuticos  $<8 \mu\text{g/l}$ , ser VHC+ y los episodios de rechazo, pero no la colestasis, se asociaron con un ADNei significativamente elevado. Adicionalmente, se observaron incrementos significativos de ADNei 4-6 días antes de diagnosticar el rechazo agudo.

En un intento por optimizar la terapia inmunodepresora, los valores de ADNei en pacientes con LTx se compararon con los niveles determinados de Tacrólimus en el mismo punto de tiempo (Oellerich *et al.*, Ther Drug Monit 36: 136-140, 2014). Se puede demostrar que los niveles sanguíneos subterapéuticos de Tacrólimus están asociados con valores elevados de ADNei (%) y de ADNei (cop./ml). En una extensión del informe de Oellerich *et al.*, para evaluar 260 muestras, se encontró que la separación era ligeramente mejor con las determinaciones absolutas (cop./ml) (Figuras 7 y 8), si se usaba un nivel sanguíneo de Tacrólimus de  $6,7 \mu\text{g/ml}$ . Ambas formas (porcentaje y número de copias) de las determinaciones de ADNei fueron útiles como ayuda para guiar la farmacoterapia inmunodepresora hacia el nivel sanguíneo mínimo necesario, en que no se detecta ninguna lesión. Cuando se estratificó a lo largo del tiempo, la precisión predictiva total definida por la suma de las muestras que son  $>$  que el delimitador de ADNei y  $<$  que el delimitador de Tacrólimus, y  $<$  que el delimitador de ADNei y  $>$  que el delimitador de Tacrólimus, dividido por todas las muestras, se observó una mejor tendencia para la expresión mediante cop./ml. El límite de ADNei (cop./ml) depende del tiempo después del LTx, dado que el nivel de Tacro es necesario para controlar el sistema inmunitario (Figura 9).

Estos resultados muestran que el ADNei es adecuado para la detección rápida, específica y temprana de la lesión del injerto después del LTx y es una medida útil de las respuestas individuales a la terapia inmunodepresora. Por consiguiente, el método se puede utilizar para evaluar la exposición eficaz más baja a inmunodepresores en las estrategias de minimización.

### Ejemplo 5. Cuantificación de ADNei para evaluar la lesión por reperfusión

Durante la fase inicial después del trasplante, se supone que un daño inicial se debe a la obtención de órganos en frío con la reperfusión en caliente consecutiva. Durante la conservación en frío es probable que un determinado número de hepatocitos entren en un estado necrótico y no puedan sobrevivir a la fase de reperfusión, la cual está dominada principalmente por procesos apoptóticos que se inician durante el almacenamiento en frío. Una evaluación de la gravedad de este daño temprano es difícil mediante las pruebas de función hepática (PFH) convencionales, dado que los hepatocitos son tanto el lado de producción como las células afectadas por el daño. Además, la disparidad entre el número de receptores potenciales de órganos y el número de órganos disponibles de donantes ha dado como resultado el uso cada vez mayor de órganos de donantes subóptimos. Este ejemplo demuestra las

asociaciones encontradas entre la evolución clínica y el ADN extracelular procedente de injerto (ADNei) cuantificado como biomarcador de la integridad del injerto en un paciente con trasplante de hígado (LTx) que recibió un hígado de donante subóptimo, y la gravedad del daño temprano debido a reperfusión.

5 El efecto del daño temprano se puede cuantificar mediante la determinación del ADNei (cop./ml), lo que muestra una clara reducción durante la primera semana después del LTx. La Figura 10 muestra los resultados obtenidos de un análisis de un donante subóptimo en comparación con la amplitud observada en otros 14 pacientes. El LTx de este órgano subóptimo mostró un buen resultado y función iniciales, lo que se predice por la rápida disminución del ADNei en el extremo inferior de todo el grupo. Además, la cantidad de necrosis del injerto se puede evaluar  
10 estimando la longitud del ADNe, el cual es corto si se libera por daño celular apoptótico y más larga si es de origen necrótico. Comparando la cantidad de ADNe determinada con una PCR digital en gotitas de longitud corta con las determinadas con una PCR dirigida a una diana más larga, se puede definir un índice apoptótico. Cuanto más alto es ese valor, más ADNe es de origen necrótico. La Figura 11 muestra el curso temporal durante los primeros días después del LTx.

15 Una comparación del ABC (d1-d5) del porcentaje y la concentración de ADNei con el tiempo de isquemia fría, el tiempo de isquemia caliente, la edad del donante y el receptor, así como la AST en una regresión multivariada, mostró un mejor valor F con ADNei absoluto ( $F = 5,8; p < 0,05$ ), comparado con los porcentajes ( $F = 0,8; p = 0,6$ ).

20 La disparidad entre el número de receptores potenciales de órganos y el número de órganos disponibles de donantes ha dado como resultado el uso cada vez mayor de órganos de donantes subóptimos.

25 En general, en la fase inicial después del LTx, el nivel absoluto de ADNei fue un predictor eficaz del daño por isquemia/reperfusión, con capacidad de evaluar la función inicial del injerto y, notablemente, la función a lo largo del tiempo si se injertan órganos subóptimos.

30 Estos resultados indican que las determinaciones de ADNei se pueden usar para controlar la recuperación temprana y el daño posterior del injerto, así como las respuestas a las intervenciones terapéuticas. Adicionalmente, el ADNei fue un indicador inmediato y sensible de la perfusión del injerto con problemas. Esta prueba se puede usar como una "biopsia líquida" para evaluar la integridad del órgano trasplantado, especialmente en receptores de hígados de donantes subóptimos.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar la integridad de un trasplante en un receptor, comprendiendo el método controlar el nivel de ADN extracelular (ADNe) de injerto mediante la evaluación de la cantidad de un alelo de SNP del donante en una muestra de ADNe obtenida de la sangre de un paciente, en donde el alelo de SNP se preselecciona con una frecuencia del alelo menos común (MAF) de al menos 0,4 y, además, en donde el alelo de SNP del donante está presente en el donante y el receptor es homocigótico para un alelo alternativo para ese SNP, en donde el alelo de SNP se identifica sin emplear una muestra de un donante distinta.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la cuantificación del nivel del alelo de SNP del donante en la muestra de ADNe comprende determinar el número de copias del alelo de SNP del donante en la muestra de ADNe o determinar el porcentaje del alelo de SNP del donante en la muestra de ADNe.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde
- (i) el material trasplantado es un órgano subóptimo;
  - (ii) la muestra de ADNe procede de una muestra de sangre obtenida diez días o más después del trasplante; un año o más después del trasplante; o en el espacio de siete días desde el trasplante;
  - (iii) el tejido del donante es un hígado, un corazón o un riñón; y/o
  - (iv) el método comprende además detectar anticuerpos específicos de donante en la sangre del receptor.
4. Un método para detectar un SNP de un donante para controlar la integridad del trasplante en un receptor que recibe tejido de dicho donante, comprendiendo el método:
- (a) identificar que un SNP que tiene una frecuencia del alelo menos común de 0,4 o mayor es homocigótico en el receptor;
  - (b) amplificar extracelular (ADNe) de una muestra de suero o plasma obtenida del receptor al menos 5 días después del trasplante de material del donante;
  - (c) realizar una reacción de PCR cuantitativa para los SNP identificados en (a), para detectar la presencia del alelo alternativo para uno o más de los SNP; y
  - (d) seleccionar un SNP donde el SNP alternativo está presente en el ADNe amplificado para controlar la integridad del trasplante del paciente.
5. El método de la reivindicación 4, en donde
- (i) la etapa (a) se realiza utilizando ADN aislado de leucocitos de sangre periférica obtenidos del paciente o usando el ADNe de la etapa (b);
  - (ii) el SNP que tiene una frecuencia del alelo menos común de 0,4 o mayor es un SNP expuesto en la Tabla 1; y/o
  - (iii) el SNP seleccionado en (d) es homocigótico en el donante.
6. Un método para detectar un SNP de un donante para controlar la integridad del trasplante en un receptor que recibe tejido de dicho donante, comprendiendo el método:
- (a) identificar que un SNP que tiene una frecuencia del alelo menos común de 0,4 o mayor es homocigótico en el receptor;
  - (b) amplificar extracelular (ADNe) de una muestra de sangre obtenida del receptor 24 horas o menos después del trasplante de material de injerto procedente del donante;
  - (c) identificar un SNP que tiene una frecuencia del alelo menos común de 0,4 o mayor como homocigótico en el donante usando el ADNe de la etapa (b);
  - (d) realizar una reacción de PCR cuantitativa para los SNP identificados en (a), para detectar la presencia del alelo alternativo para uno o más de los SNP en el donante, y
  - (e) seleccionar un SNP donde el SNP alternativo es homocigótico en el donante.
7. El método de la reivindicación 6, en donde
- (i) la etapa (a) se realiza utilizando ADN aislado de leucocitos de sangre periférica obtenidos del paciente; y/o
  - (ii) el SNP que tiene una frecuencia del alelo menos común de 0,4 o mayor es un SNP expuesto en la Tabla 1.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que comprende además obtener una muestra de ADNe del receptor después del trasplante de tejido de donante; y cuantificar el nivel del alelo de SNP del donante en la muestra de ADNe, en donde opcionalmente
- (i) la etapa de cuantificación comprende determinar el número de copias del alelo de SNP del donante en la muestra de ADNe o determinar el porcentaje del alelo de SNP del donante en la muestra de ADNe;
  - (ii) el material trasplantado es un órgano subóptimo;

- (iii) la muestra de ADN<sub>e</sub> procede de una muestra de sangre obtenida diez días o más después del trasplante; o un año o más después del trasplante; en donde opcionalmente el método comprende además ajustar un pauta de administración o dosificación o de un fármaco inmunodepresor;
- 5 (iv) la muestra de ADN<sub>e</sub> procede de una muestra de sangre obtenida en el espacio de siete días desde el trasplante;
- (v) el tejido del donante es un hígado, un corazón o un riñón; y/o
- (vi) el método comprende además detectar anticuerpos específicos de donante en la sangre del receptor.
- 10 9. Uso del método de las reivindicaciones 1 a 3 u 8 para:
- detectar daño por reperfusión en el tejido de donante en un receptor de trasplante;
- detectar daño en el tejido hepático del donante por un virus de la hepatitis en un receptor de trasplante, detectar una nefropatía crónica del injerto o detectar una vasculopatía del injerto;
- 15 determinar la dosis eficaz mínima de un fármaco inmunodepresor; y/o
- detectar daño del trasplante por anticuerpos específicos de donante o una lesión crónica del trasplante.
- 20 10. Un método para controlar la integridad de un trasplante en un receptor de trasplante, comprendiendo el método, cuantificar, en una muestra de ADN<sub>e</sub> obtenida del receptor del trasplante, la cantidad de un alelo de SNP del donante para un SNP seleccionado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
11. El método de la reivindicación 10, en donde
- 25 (i) el trasplante es un órgano subóptimo;
- (ii) el trasplante se controla para detectar daño por reperfusión;
- (iii) el trasplante se controla para determinar la dosis eficaz más baja de un fármaco inmunodepresor;
- (iv) el trasplante se controla para detectar daño del trasplante por anticuerpos específicos de donante o
- 30 (v) el trasplante es un hígado, riñón o corazón.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el SNP se selecciona usando un método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8.
- 35 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde la PCR cuantitativa es PCR en tiempo real.

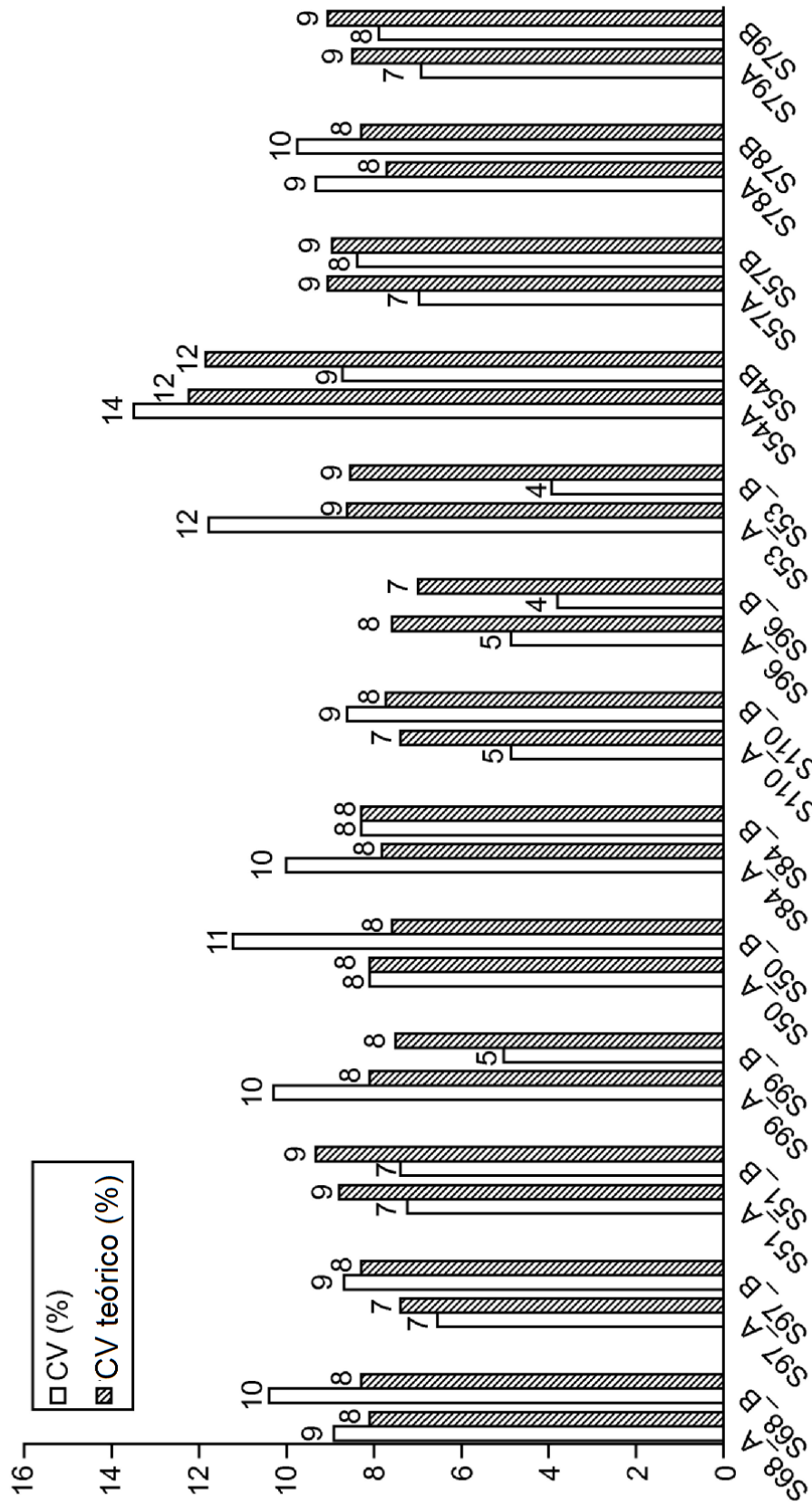


FIG. 1

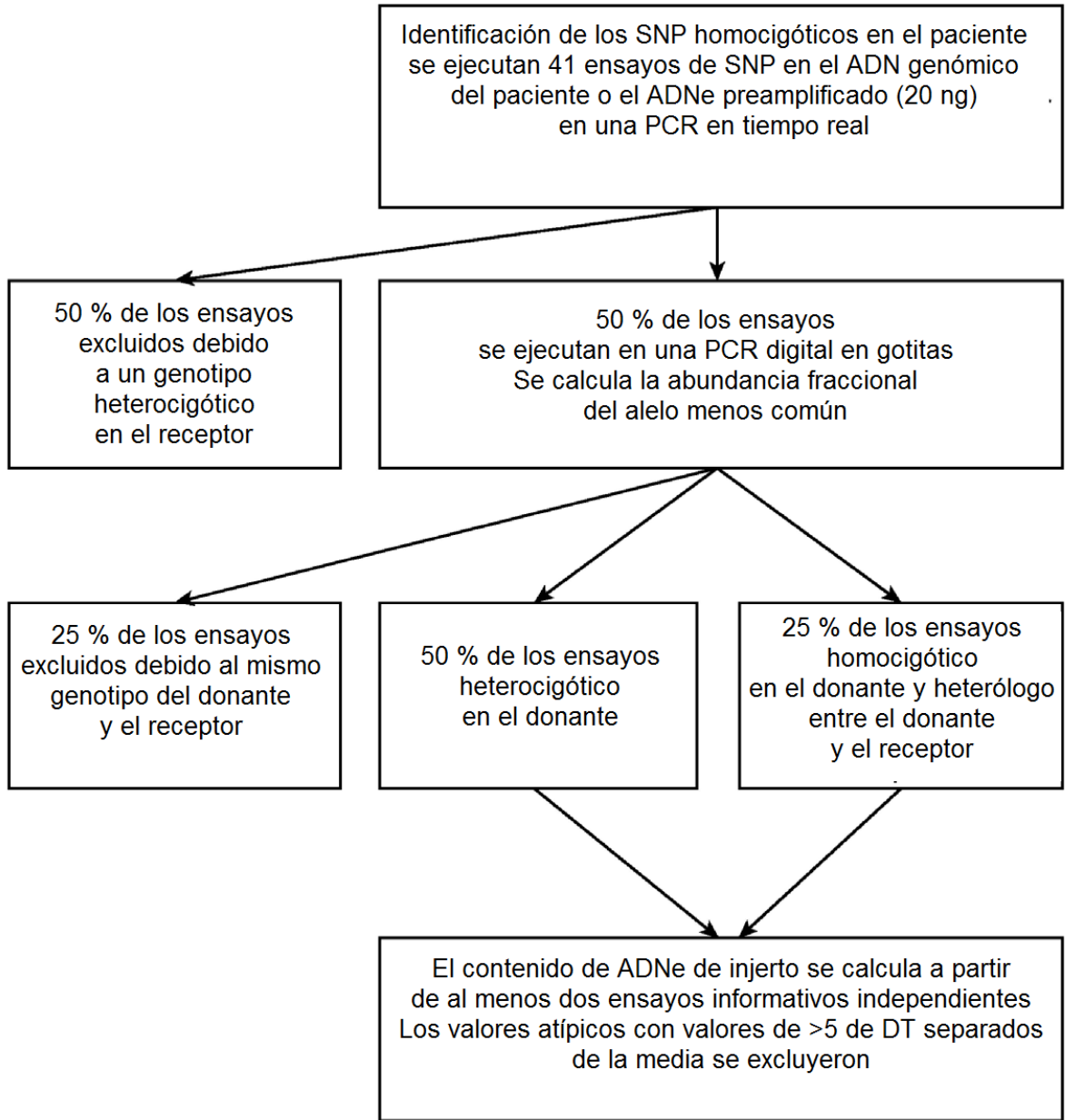


FIG. 2



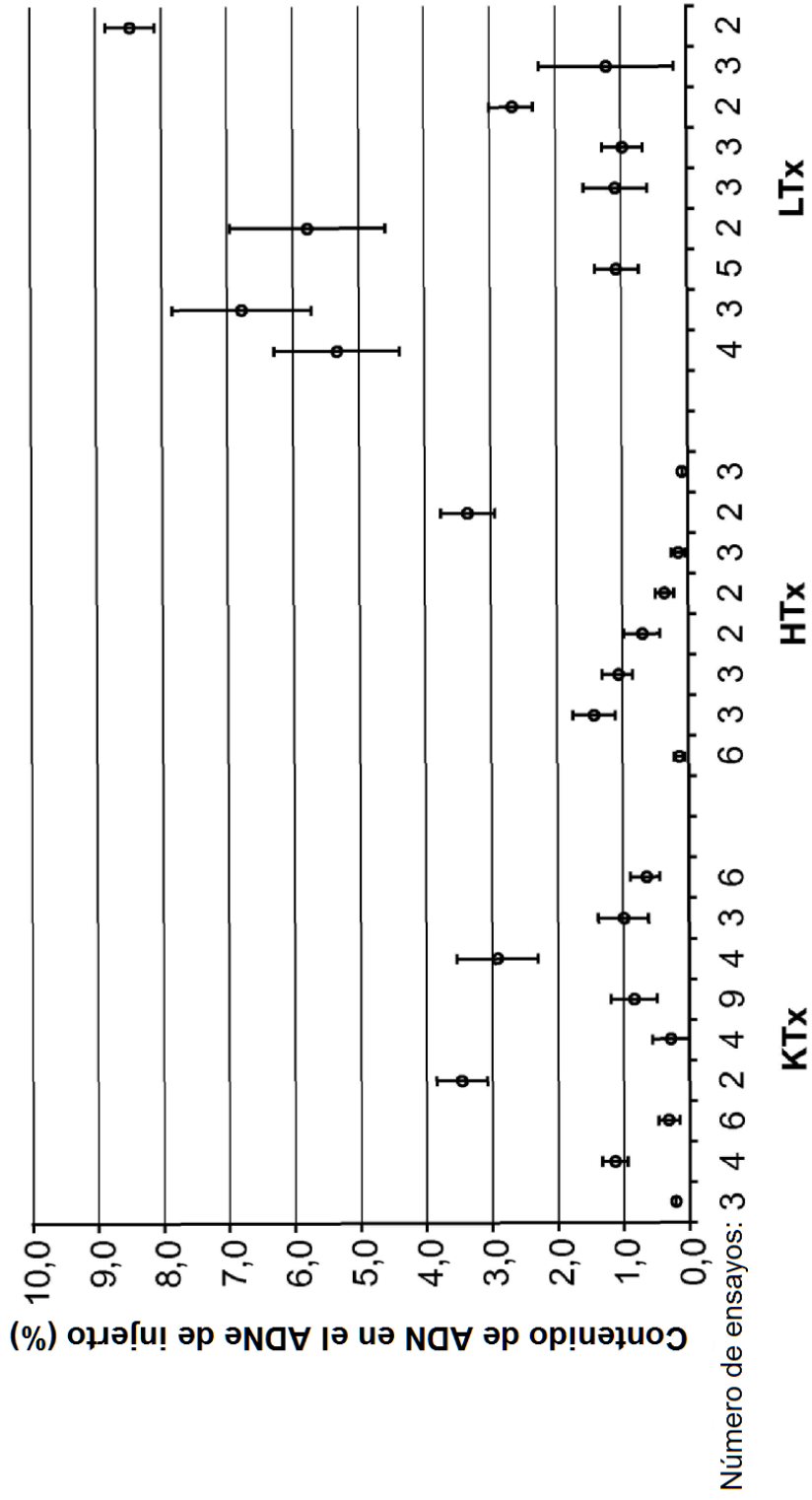


FIG. 3

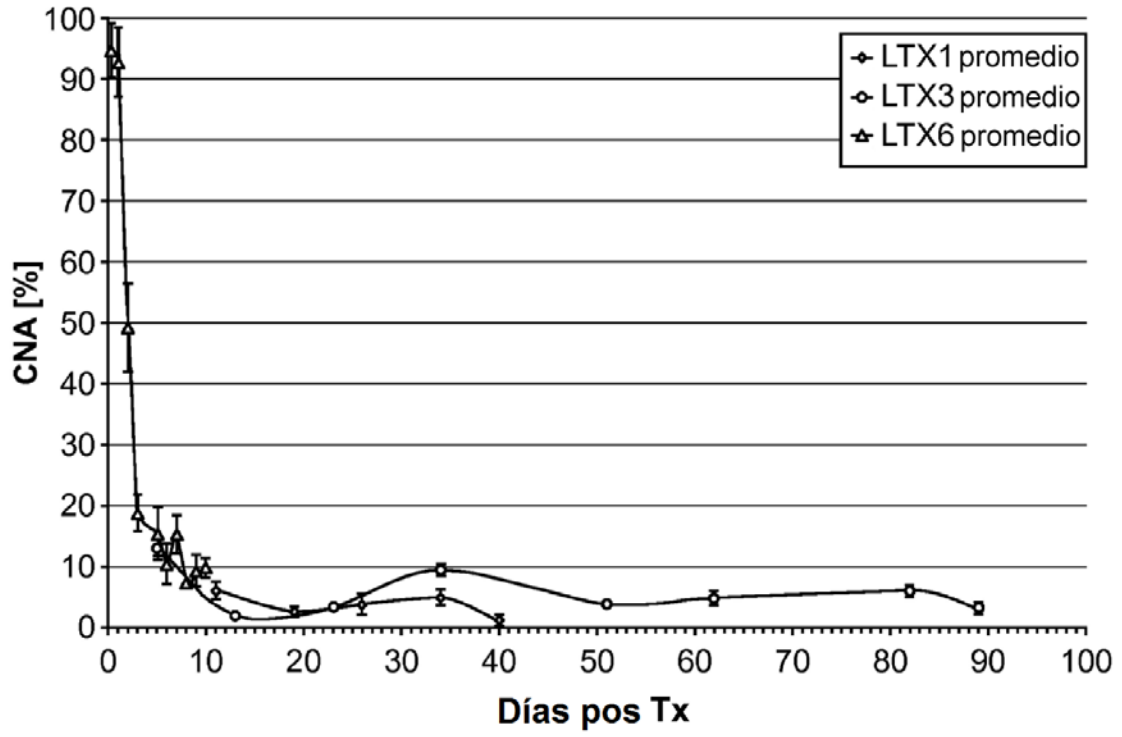


FIG. 4

Aumento de ADNe procedente de implante precedió a AST y bilirrubina en el rechazo de injerto de hígado

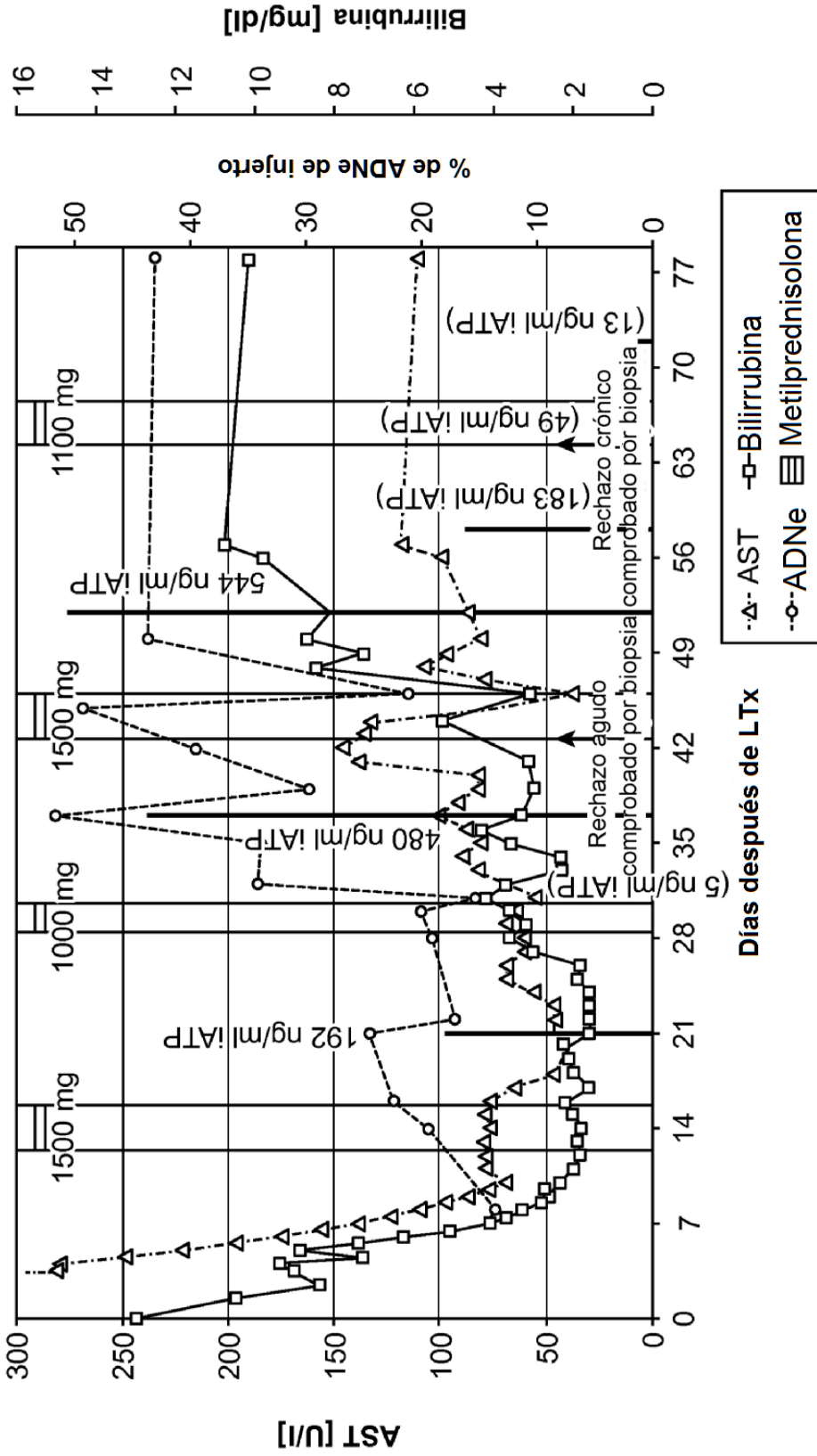


FIG. 5

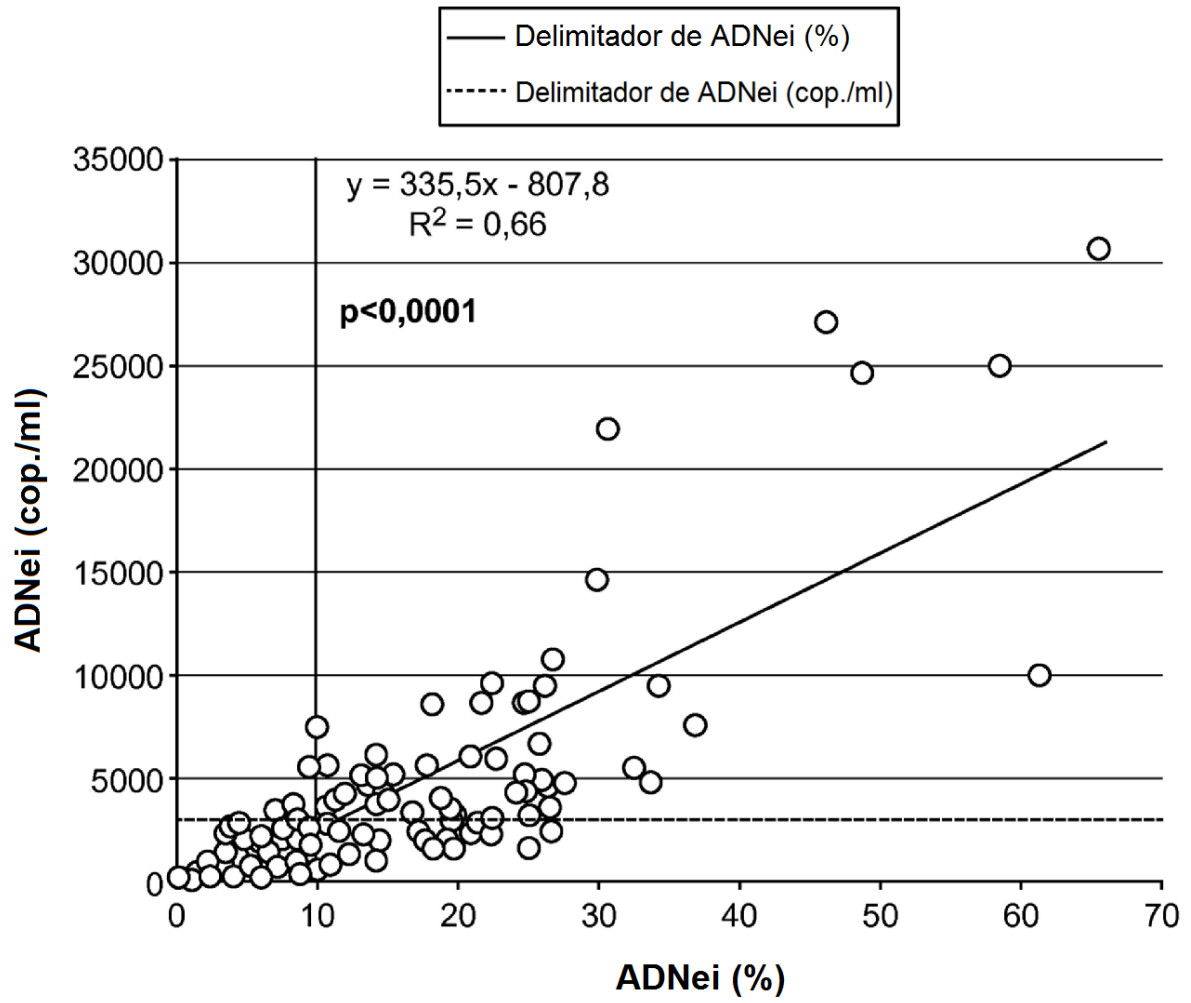


FIG. 6

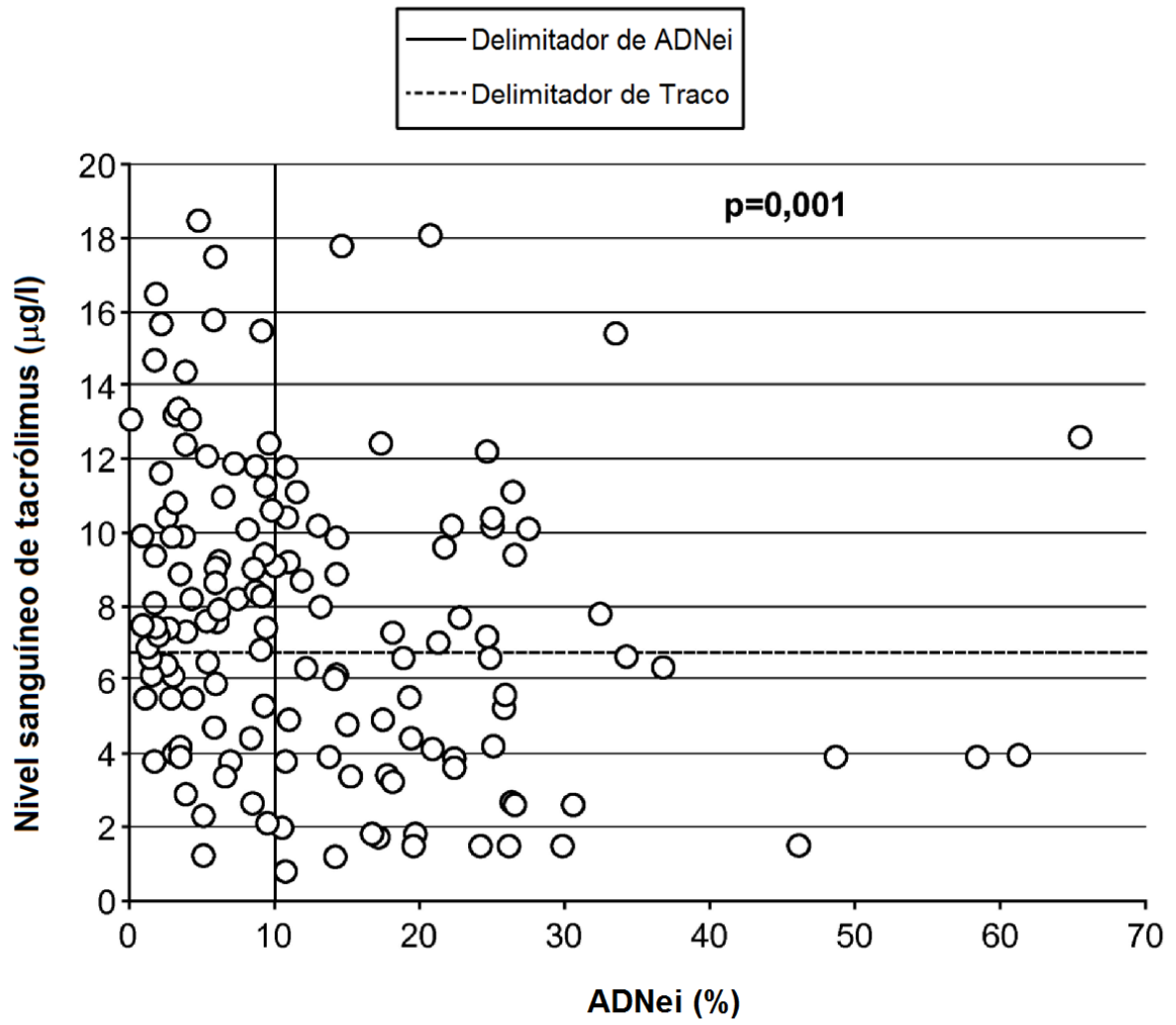


FIG. 7

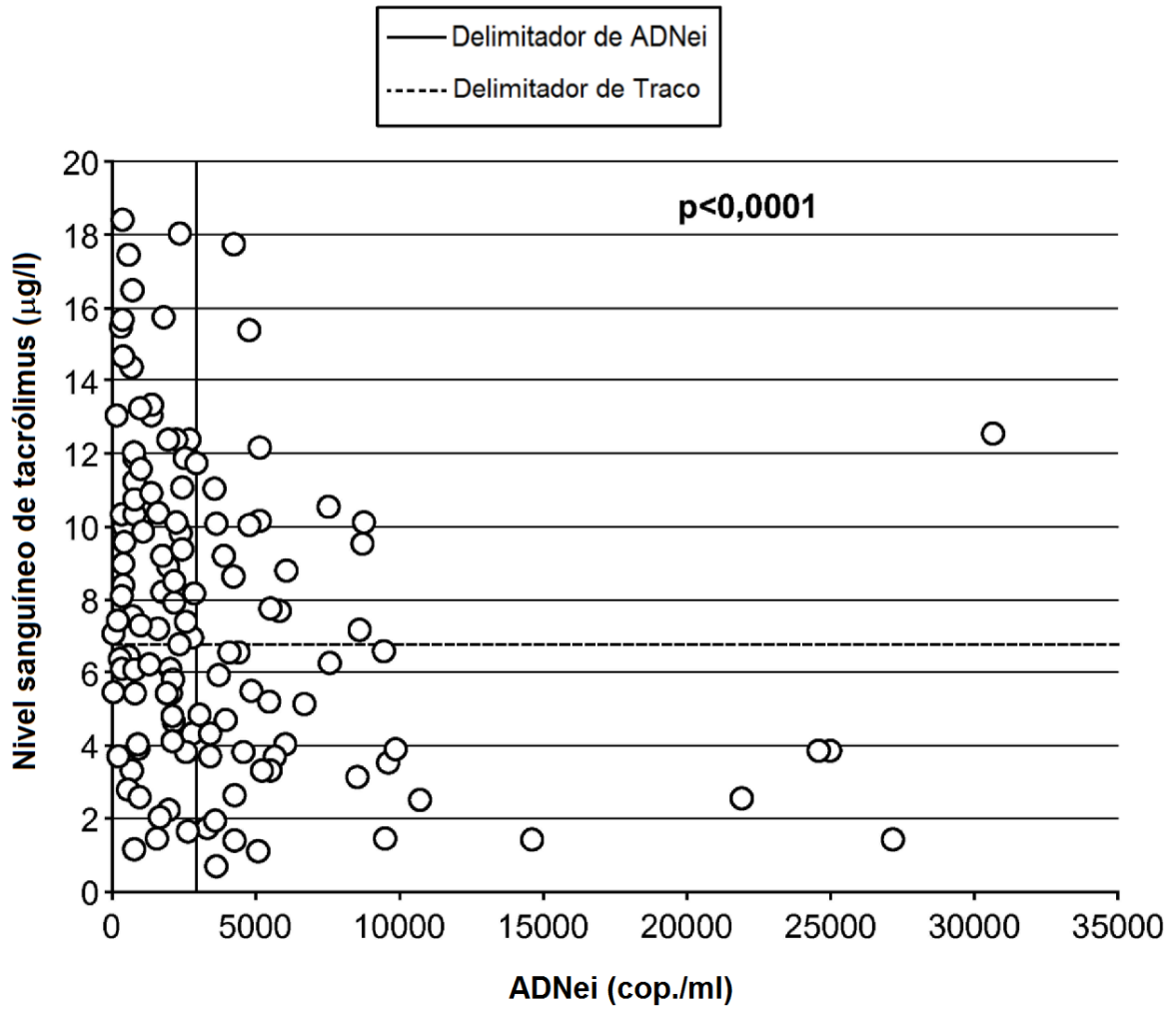


FIG. 8

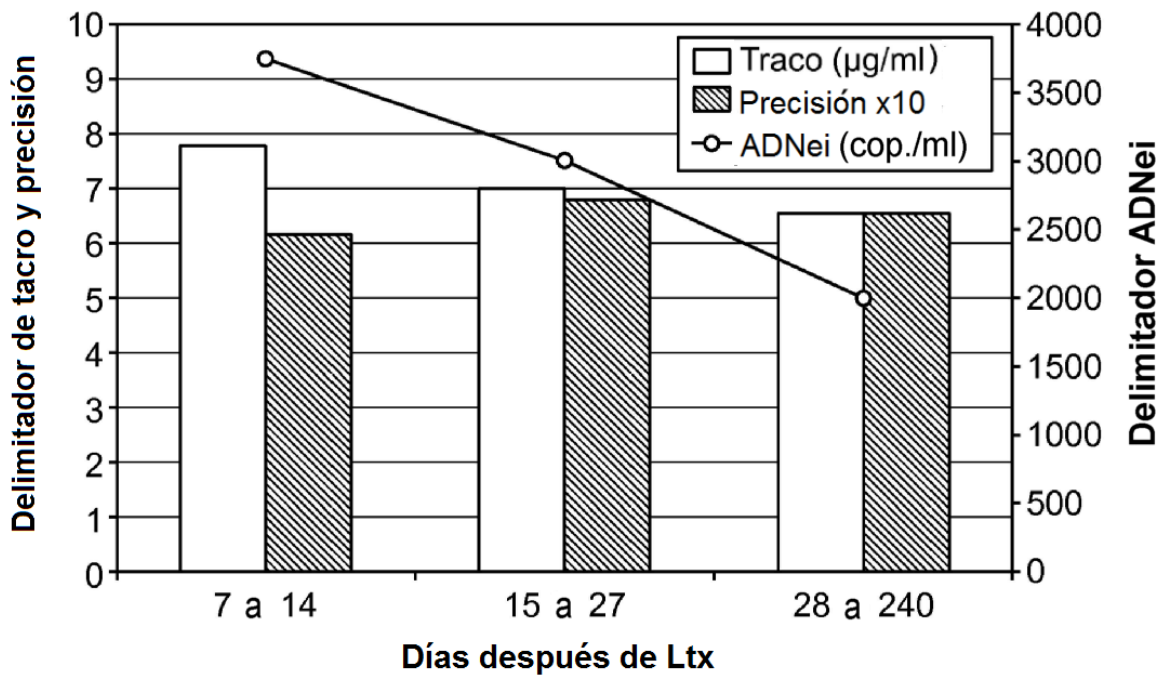
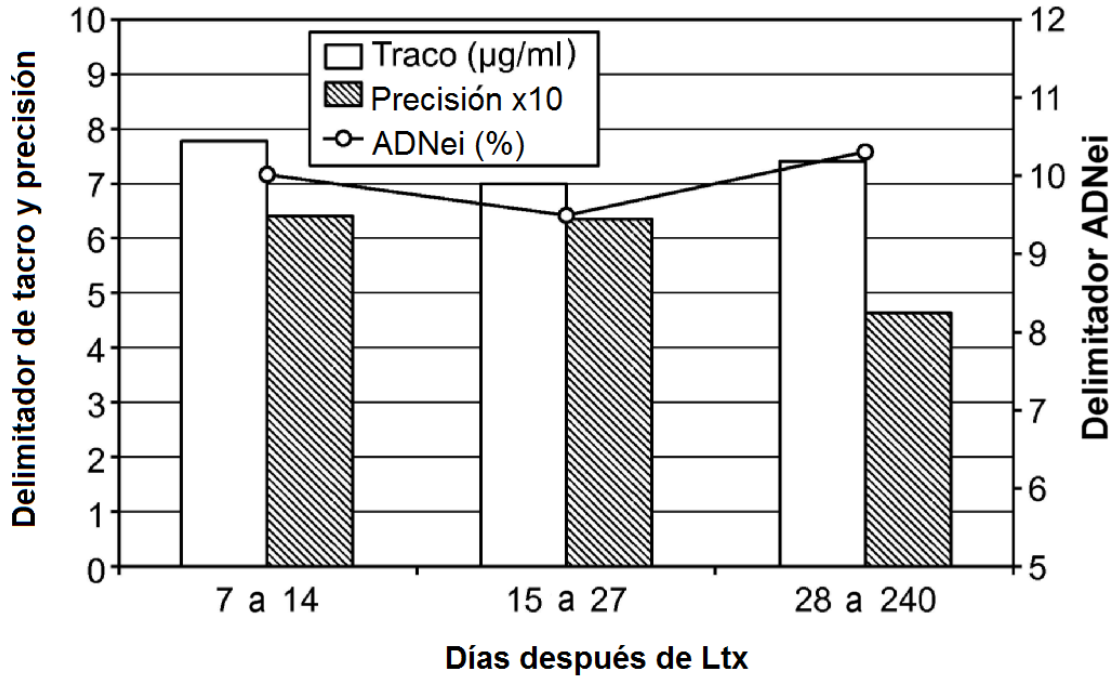


FIG. 9

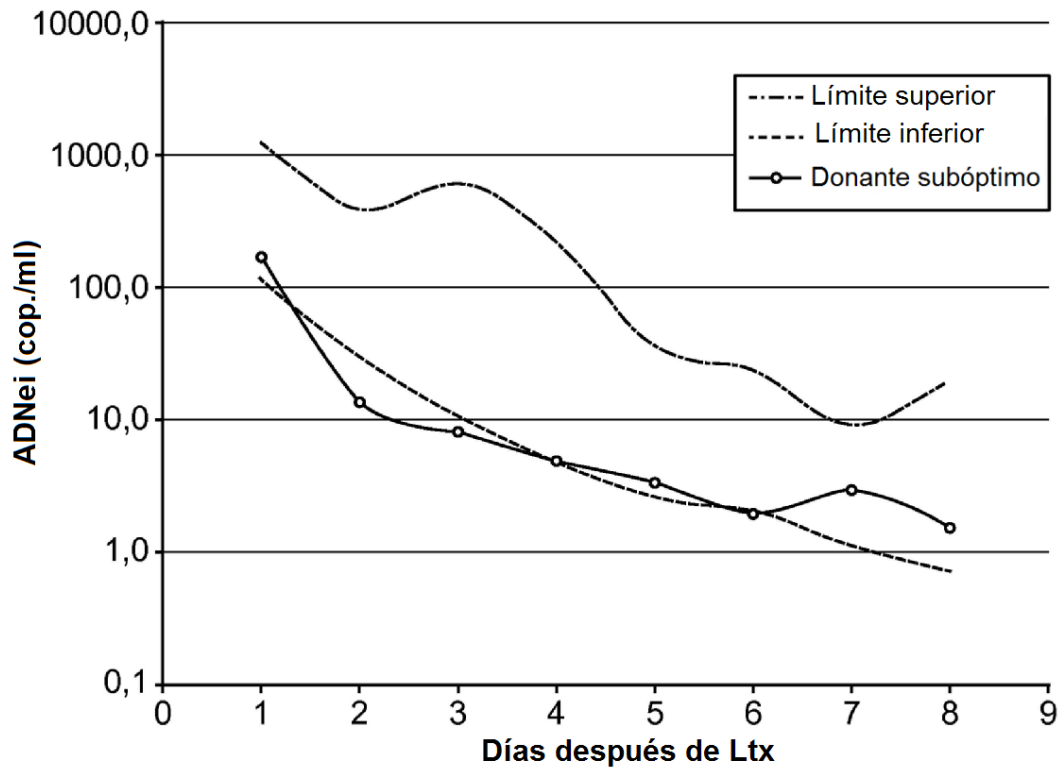


FIG. 10



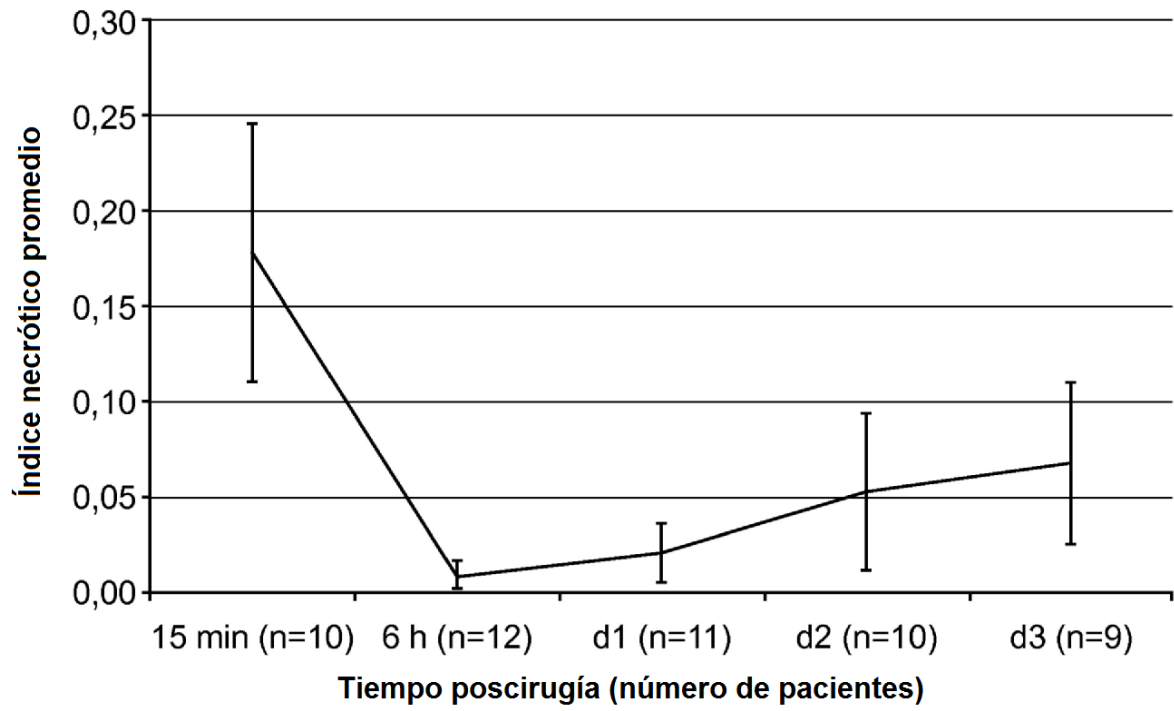


FIG. 11