

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 500**

51 Int. Cl.:

G16B 20/00 (2009.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2010 PCT/US2010/055604**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011 WO11057061**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2010 E 10829142 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 2496720**

54 Título: **Diagnóstico no invasivo del rechazo de injertos en pacientes con trasplante de órganos**

30 Prioridad:

06.11.2009 US 280674 P

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

26.04.2021

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
Office of the General Counsel, Building 170, Third
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**QUAKE, STEPHEN R.;
SNYDER, THOMAS M. y
VALANTINE, HANNAH**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 821 500 T3

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

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico no invasivo del rechazo de injertos en pacientes con trasplante de órganos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] El trasplante de órganos es un procedimiento médico importante que salva vidas en los casos en que un paciente tiene insuficiencia o fallo de órganos, y ahora es posible trasplantar muchos órganos incluyendo el corazón, los pulmones, el riñón, y el hígado. En algunos casos, el paciente receptor rechaza el órgano trasplantado, lo que crea una situación potencialmente mortal. Monitorear al paciente para detectar el rechazo es difícil y costoso, a menudo requiere procedimientos invasivos. Además, los métodos de vigilancia actuales carecen de la sensibilidad adecuada. Li y col. (Clinical Chemistry 49, Nº 4, 2003, páginas 655-658) enseña la detección de polimorfismos de ADN específicos del donante en la orina de receptores de trasplante renal. La solicitud de patente EP1325963 enseña un método o proceso para medir la cantidad de ADNmt circulatorio libre de células en fluidos corporales como indicador o marcador de daño tisular y utilizar polimorfismos de ADNmt para discriminar entre daño tisular del donante y del receptor en un entorno de trasplante.

[0002] La presente invención resuelve estos problemas proporcionando métodos no invasivos de monitorización de pacientes de trasplante cardiaca para el rechazo que son sensibles, rápidos y baratos.

Resumen de la invención

[0003] La invención proporciona un método para diagnosticar, predecir o controlar el estado de trasplante o resultado que comprende:

determinar, en una muestra de un sujeto que ha recibido un trasplante de órganos sólidos de un donante, la presencia o ausencia de uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células del trasplante de órganos sólidos del donante, donde uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células son regiones de ADN genómico que contienen polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), donde uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células del trasplante de órganos sólidos del donante se identifican en función de un perfil de marcador predeterminado, en el que dicho perfil de marcador es un perfil de marcador polimórfico y dicho perfil de marcador polimórfico comprende uno o más polimorfismos de nucleótido único (SNP), y en el que la presencia o ausencia de dichos uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células se determina mediante secuenciación de alto rendimiento de múltiples ácidos nucleicos libres de células diferentes de la muestra; y diagnosticar, predecir o controlar el estado o resultado del trasplante basándose en la presencia o ausencia del uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células del trasplante de órgano sólido de donante, en el que el trasplante de órgano sólido es un trasplante de corazón.

[0004] En algunas realizaciones, el estado de trasplante o resultado comprende el rechazo, la tolerancia, lesión de aloinjerto basada en no rechazo, la función del trasplante, la supervivencia del trasplante, lesión de trasplantes crónicos, o inmunosupresión farmacológica de título. En algunas realizaciones, la lesión por aloinjerto no basada en rechazo se selecciona del grupo de lesión isquémica, infección por virus, isquemia perioperatoria, lesión por reperfusión, hipertensión, estrés fisiológico, lesiones debidas a especies reactivas de oxígeno y lesiones causadas por agentes farmacéuticos.

[0005] En algunas realizaciones, la muestra se selecciona de entre el grupo que consiste en sangre, suero, orina y heces.

[0006] En algunas realizaciones, el perfil de marcador se determina por genotipo del donante del trasplante. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además genotipar el sujeto que recibe el trasplante. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además establecer un perfil de SNP, donde los SNP son distinguibles entre el donante de trasplante y el sujeto que recibe el trasplante. En algunas realizaciones, la genotipificación se realiza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en secuenciación, matriz de ácido nucleico y PCR.

[0007] En algunas realizaciones, el ácido nucleico circulante libre de células se selecciona del grupo que consiste en ADN, el ADN bicatenario de una sola hebra, horquillas de ADN monocatenario, híbridos de ADN/ARN, ARN y horquillas de ARN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico circulante libre de células se selecciona del grupo que consiste en ADN bicatenario, ADN monocatenario y ADNc. En algunas realizaciones, el ácido nucleico libre de células circulante es ARNm. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADN circulante libre de células.

[0008] La presencia o ausencia del uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células en la muestra de un sujeto que ha recibido un trasplante de corazón de un donante se determina por secuenciación de alto rendimiento. En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento es una secuenciación rápida.

[0009] En algunas realizaciones, los métodos además comprenden la cuantificación de uno o más ácidos nucleicos

circulantes libres de células. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células es indicativa del estado o resultado del trasplante. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células por encima de un valor umbral predeterminado es indicativa del estado o resultado del trasplante. En algunas realizaciones, el umbral es un valor normativo para pacientes post-trasplante clínicamente estables sin evidencia de rechazo al trasplante u otras patologías. En algunas realizaciones, existen diferentes valores umbral predeterminados para diferentes resultados o estados del trasplante. En algunas realizaciones, las diferencias temporales en la cantidad de uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células son indicativas del estado o resultado del trasplante.

[0010] En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento tienen sensibilidad de al menos 56%. En algunas realizaciones, los métodos descritos aquí tienen al menos un 78% de sensibilidad. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento tienen una especificidad de aproximadamente 70% a aproximadamente 100%. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento tienen una especificidad de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 100%. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento tienen una especificidad de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 100%. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento tienen una especificidad de aproximadamente el 100%.

[0011] También se describen aquí medios legibles por ordenador que comprenden: un conjunto de instrucciones sobre los mismos grabadas para hacer que un ordenador realice los pasos de: (i) recibir datos de uno o más ácidos nucleicos detectados en una muestra de un sujeto que ha recibido un trasplante de corazón de un donante, donde uno o más ácidos nucleicos son ácidos nucleicos del trasplante de donante, y donde el uno o más ácidos nucleicos del donante se identifican basándose en un perfil de marcador predeterminado; y (ii) diagnosticar o predecir el estado o resultado del trasplante basándose en la presencia o ausencia del uno o más ácidos nucleicos.

[0012] También se describen en este documento reactivos y kits de los mismos para la práctica de uno o más de los métodos descritos aquí.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0013] Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que establece realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos, de los cuales:

Figura 1 muestra la supervivencia del paciente después del diagnóstico de CAV.

Figura 2 muestra la detección de ADN del donante en pacientes que reciben trasplantes de género no coincidente.

Figura 3 muestra un estudio de curso temporal para la detección de ADN de un donante en un paciente de trasplante que recibió un trasplante de género diferente y sufrió un episodio de rechazo 3A.

Figura 4 muestra un estudio de curso temporal para la detección de ADN de un donante en un paciente de trasplante que recibió un trasplante de género diferente y sufrió un episodio de rechazo 3A.

Figura 5 muestra una estrategia general para monitorear a todos los pacientes trasplantados.

Figura 6 muestra los resultados de la secuenciación comparando cuatro niveles de sustituciones del ADN del donante en el ADN del receptor.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0014] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

[0015] Esta invención se refiere a métodos sensibles y no invasivos para la monitorización de pacientes con trasplante de corazón, y/o para diagnosticar o predecir el estado de trasplante de corazón o el resultado (por ejemplo, el rechazo de trasplantes). En algunas realizaciones, los métodos se utilizan para establecer un genotipo tanto para el donante como para el receptor antes del trasplante para permitir la detección de ácidos nucleicos circulantes libres de células específicos del donante, como ADN o ARN, en fluidos corporales como sangre u orina del receptor del órgano después del trasplante.

[0016] En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden la determinación de si un paciente o sujeto está mostrando tolerancia trasplante de corazón. El término "tolerancia al trasplante" incluye cuando el sujeto no rechaza un órgano, tejido o célula(s) de injerto que se ha introducido en/sobre el sujeto. En otras palabras, el sujeto tolera o mantiene el órgano, tejido o célula(s) que se le ha trasplantado. El término "paciente" o "sujeto", como se usa en este documento, incluye seres humanos así como otros mamíferos.

[0017] En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden el diagnóstico o predicción del rechazo del trasplante de corazón. El término "rechazo de trasplantes" abarca el rechazo de trasplantes tanto agudo como crónico. El "rechazo agudo o RA" es el rechazo por parte del sistema inmunológico de un receptor de trasplante de tejido cuando el tejido trasplantado es inmunológicamente extraño. El rechazo agudo se caracteriza por la infiltración del

tejido trasplantado por células inmunes del receptor, que realizan su función efectora y destruyen el tejido trasplantado. El inicio del rechazo agudo es rápido y, por lo general, ocurre en humanos unas pocas semanas después de la cirugía de trasplante. Generalmente, el rechazo agudo puede inhibirse o suprimirse con fármacos inmunosupresores tales como rapamicina, ciclosporina A, anticuerpo monoclonal anti-CD40L y similares.

[0018] El "rechazo crónico de trasplantes o RC" generalmente ocurre en humanos dentro de varios meses a años después del injerto, incluso en presencia de inmunosupresión exitosa de rechazo agudo. La fibrosis es un factor común en el rechazo crónico de todo tipo de trasplantes de órganos. El rechazo crónico se puede describir típicamente mediante una variedad de trastornos específicos que son característicos del órgano en particular. Por ejemplo, en los trasplantes de pulmón, tales trastornos incluyen destrucción fibroproliferativa de las vías respiratorias (bronquiolitis obliterante); en trasplantes de corazón o trasplantes de tejido cardíaco, tales como reemplazos de válvulas, tales trastornos incluyen aterosclerosis fibrótica; en los trasplantes de riñón, tales trastornos incluyen, nefropatía obstructiva, nefrosclerosis, nefropatía tubulointerstial; y en los trasplantes de hígado, tales trastornos incluyen el síndrome de la vía biliar que desaparece. El rechazo crónico también se puede caracterizar por daño isquémico, deservación del tejido trasplantado, hiperlipidemia e hipertensión asociada con fármacos inmunosupresores.

[0019] En algunas realizaciones, el método de la invención incluye además la determinación de un régimen inmunosupresor para un sujeto que ha recibido un trasplante de corazón, por ejemplo, un aloinjerto.

[0020] Ciertas realizaciones de los métodos de la invención comprenden la predicción de la supervivencia del trasplante en un sujeto que ha recibido un trasplante de corazón. La invención proporciona métodos para diagnosticar o predecir si un trasplante en un paciente o sujeto trasplantado sobrevivirá o se perderá. En determinadas realizaciones, la invención proporciona métodos para diagnosticar o predecir la presencia de supervivencia del injerto a largo plazo. Por supervivencia del injerto "a largo plazo" se entiende la supervivencia del injerto durante al menos aproximadamente 5 años más allá del muestreo actual, a pesar de la aparición de uno o más episodios previos de rechazo agudo. En determinadas realizaciones, la supervivencia del trasplante se determina para pacientes en los que ha ocurrido al menos un episodio de rechazo agudo. Como tales, estas realizaciones proporcionan métodos para determinar o predecir la supervivencia del trasplante después del rechazo agudo. La supervivencia del trasplante se determina o predice en determinadas realizaciones en el contexto de la terapia de trasplante, por ejemplo, terapia inmunosupresora, donde las terapias inmunosupresoras son conocidas en la técnica. En otras realizaciones más, se proporcionan métodos para determinar la clase y/o la gravedad del rechazo agudo (y no solo la presencia del mismo).

[0021] En algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden el diagnóstico o predicción de lesión de trasplante no basada en rechazo. Los ejemplos de lesión de injerto no basada en rechazo incluyen, pero no se limitan a, lesión isquémica, infección por virus, isquemia perioperatoria, lesión por reperfusión, hipertensión, estrés fisiológico, lesiones debidas a especies reactivas de oxígeno y lesiones causadas por agentes farmacéuticos.

[0022] Como es conocido en el campo del trasplante, el trasplante de órganos, tejido o célula(s) puede ser alogénico o xenogénico, de manera que los injertos pueden ser aloinjertos o xenoinjertos. Una característica del fenotipo tolerante al injerto detectado o identificado por los métodos objeto es que es un fenotipo que ocurre sin terapia inmunosupresora, es decir, está presente en un hospedador que no está sometido a terapia inmunosupresora de manera que no se administran agentes inmunosupresores al paciente huésped.

[0023] Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto claramente dicte otra cosa, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro indicado o el valor intermedio en ese rango indicado, está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse independientemente en los rangos más pequeños y también están incluidos dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el rango indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, también se incluyen en la invención los intervalos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos.

[0024] En el presente documento se presentan determinados intervalos con valores numéricos precedidos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" se usa en este documento para proporcionar soporte literal para el número exacto que precede, así como un número que está cerca o aproximadamente al número que precede el término. Para determinar si un número está cerca o aproximadamente a un número recitado específicamente, el número no recitado cercano o aproximado puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporciona el equivalente sustancial del número recitado específicamente.

[0025] La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de inmunología, bioquímica, química, biología molecular, microbiología, biología celular, genómica y ADN recombinante, que están dentro de la experiencia de la técnica. Ver Sambrook, Fritsch y Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª edición (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (FM Ausubel, et al. Eds., (1987)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (MJ MacPherson, BD Hames y GR Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (RI Freshney, ed. (1987)).

Introducción

[0026] Se proporcionan métodos para diagnosticar o predecir el estado o el resultado del trasplante en un sujeto que ha recibido un trasplante de corazón.

[0027] Como se mencionó anteriormente, el seguimiento de los pacientes de trasplante para el estado de trasplante o el resultado es difícil y costoso, requiriendo a menudo procedimientos no sensibles e invasores. Por ejemplo, en pacientes con trasplante de corazón, la vigilancia del rechazo agudo requiere biopsias endomiocárdicas seriadas que se realizan de forma rutinaria a intervalos semanales y mensuales durante el año inicial después del trasplante, con un total de 6-8 biopsias en la mayoría de los pacientes. Los avances en la inmunosupresión, la vigilancia del rechazo y el reconocimiento y tratamiento tempranos de infecciones potencialmente mortales han llevado a mejoras continuas en los resultados tempranos después del trasplante cardíaco. (Taylor, DO, et al., J Heart Lung Transplant, 27, 943-956 (2008)). Sin embargo, no ha habido una mejora similar en la mortalidad tardía, que es en gran parte atribuible a la vasculopatía del aloinjerto cardíaco (CAV) (Figura 1). En la actualidad, el CAV sigue siendo la principal causa de fracaso tardío del injerto y muerte entre los casi 22.000 receptores de trasplantes de corazón vivos en los Estados Unidos. La detección temprana de CAV, antes del desarrollo de la enfermedad angiográficamente aparente, disfunción del injerto, o inicio de los síntomas es importante porque mortalidad de los pacientes después de la detección mediante angiografía coronaria (el estándar de cuidado) es inaceptablemente alta, con tasas de mortalidad a 2 años de 50% que ha sido informado. Los métodos de vigilancia actuales para CAV carecen de sensibilidad adecuada o requieren procedimientos invasivos y el método más comúnmente aplicado, la angiografía coronaria, carece de sensibilidad (Kobashigawa, JA, et al., J Am Coll Cardiol, 45, 1532-1537 (2005)). El diagnóstico tardío debido a la subestimación de la gravedad de la enfermedad es una característica de la angiografía coronaria que se supera en gran medida mediante la ecografía intravascular (IVUS). (Fitzgerald, PJ, et al., Circulation, 86, 154-158 (1992)). Sin embargo, ambos métodos invasivos de catéter arterial en el corazón izquierdo son costosos, requiere muchos recursos y se asocia con un riesgo significativo de morbilidad y malestar del paciente. La detección temprana de CAV, antes del desarrollo de enfermedad aparente angiográficamente, disfunción del injerto o inicio de síntomas es crucial para guiar el uso apropiado de terapias emergentes que retrasan y ocasionalmente revierten la progresión de CAV. El desarrollo de marcadores para la detección temprana, no invasiva, segura y rentable del rechazo agudo y CAV, y su rápida traducción a una prueba práctica y confiable que se puede utilizar en la clínica, representa una importante necesidad médica insatisfecha para los casi 22.000 receptores de trasplantes de corazón vivos en los Estados Unidos y un número similar en todo el mundo.

[0028] La urgente necesidad de un diagnóstico precoz y el riesgo de estratificación es aún más por estudios recientes que demuestran la progresión y/o inversión de retraso CAV después de la intervención con regímenes inmunosupresores más nuevos. Dado que el uso de estas terapias más nuevas se ve obstaculizado por los efectos adversos, las interacciones farmacológicas y el costo, es importante identificar a los pacientes en los que los beneficios superan los riesgos. Aparte de su impacto sobre la mortalidad y la morbilidad, la vigilancia de CAV es costosa en términos de utilización de recursos y potencial de complicaciones para el paciente. Dado el estándar de atención actual para realizar una angiografía coronaria anual durante los primeros cinco años después del trasplante de corazón, cada paciente que haya sobrevivido hasta el año 5 habrá recibido 4 angiogramas por un costo promedio de carga completa de 25.000 \$ por angiograma. Dado que la tasa de supervivencia a 5 años después del trasplante de corazón es del 72%, aproximadamente 1.440 pacientes de los 2.000 pacientes que reciben trasplantes de corazón cada año se someterán a 4 procedimientos para un total de al menos 5.760 procedimientos. A un costo promedio de 25.000 \$ por angiograma coronario, esto ascenderá a 144.000.000 \$ por año en dólares de atención médica para monitorear a los pacientes después de un trasplante de corazón. Una prueba no invasiva que identifique a los pacientes con bajo riesgo de CAV significaría que la angiografía coronaria podría evitarse con seguridad en este grupo, reduciendo así considerablemente el coste de su manejo a largo plazo.

a. Ácidos nucleicos circulantes

[0029] El ADN circulante o libre de células se detectó por primera vez en el plasma sanguíneo humano en el año 1948 (Mandel, P. Metais, P., C R Acad. Sci. Paris, 142, 241-243 (1948)). Desde entonces, su conexión con la enfermedad se ha establecido en varias áreas. (Tong, YK Lo, YM, Clin Chim Acta, 363, 187-196 (2006)). Los estudios revelan que muchos de los ácidos nucleicos circulantes en la sangre surgen de células necróticas o apoptóticas (Giacona, MB, et al., Pancreas, 17, 89-97 (1998)) y se observan niveles muy elevados de ácidos nucleicos de apoptosis en enfermedades como el cáncer (Giacona, MB, et al., Pancreas, 17, 89-97 (1998); Fournie, GJ, et al., Cancer Lett, 91, 221-227 (1995)). Particularmente para el cáncer, donde el ADN circulante lleva el sello. Los signos de la enfermedad, incluidas mutaciones en oncogenes, alteraciones de microsatélites y, para ciertos cánceres, secuencias genómicas virales, ADN o ARN en plasma, se han estudiado cada vez más como un biomarcador potencial de la enfermedad. Por ejemplo, Diehl et al demostraron recientemente que un ensayo cuantitativo para niveles bajos de ADN tumoral circulante en el ADN circulante total podría servir como un mejor marcador para detectar la recaída del cáncer colorrectal en comparación con el antígeno carcinoembrionario, el biomarcador estándar usado clínicamente. (Diehl, F., et al., Proc Natl Acad Sci, 102, 16368-16373 (2005); Diehl, F., et al., Nat Med, 14, 985-990 (2008)) Maheswaran et al informaron uso de genotipado de células circulantes en plasma para detectar mutaciones activadoras en los receptores del factor de crecimiento epidérmico en pacientes con cáncer de pulmón que podrían afectar el tratamiento farmacológico (Maheswaran, S., et al., N Engl J Med, 359, 366-377 (2008)). Estos resultados establecen

colectivamente tanto el ADN circulante, ya sea libre en plasma como de células circulantes, como una especie útil en la detección y el tratamiento del cáncer. El ADN circulante también ha sido útil en pacientes sanos para el diagnóstico fetal, y el ADN fetal circulando en la sangre materna sirve como marcador de género, estado de rhesus D, aneuploidía fetal y trastornos ligados al sexo. Fan et al demostraron recientemente una estrategia para detectar la aneuploidía fetal mediante la secuenciación rápida del ADN libre de células extraído de una muestra de sangre materna, una metodología que puede reemplazar a técnicas más invasivas y riesgosas como la amniocentesis o el muestreo de vellosidades coriónicas. (Fan, HC, Blumenfeld, YJ, Chitkara, U., Hudgins, L., Quake, SR, Proc Natl Acad Sci, 105, 16266-16271 (2008)).

5
10 **[0030]** En todas estas aplicaciones de ácidos nucleicos circulantes, se ha utilizado la presencia de secuencias que difieren del genotipo normal de un paciente para detectar la enfermedad. En el cáncer, las mutaciones de genes son una señal reveladora del avance de la enfermedad; en el diagnóstico fetal, la detección de secuencias específicas del feto en comparación con el ADN materno permite analizar la salud del feto.

15 **[0031]** La invención proporciona diagnósticos no invasivos para pacientes con trasplante de corazón, donde las secuencias del donante de órganos, de otro modo "extranjeras" para el paciente, pueden ser cuantificadas específicamente. Sin pretender limitarse a ninguna teoría, dado que el ADN o ARN libre de células a menudo surge de células apoptóticas, la cantidad relativa de secuencias específicas del donante en los ácidos nucleicos circulantes debería proporcionar una medida predictiva de la inminente insuficiencia orgánica en pacientes trasplantados para muchos tipos de trasplante de órganos sólidos que incluyen, entre otros, corazón, pulmón, hígado y riñón.

b. Ácidos nucleicos circulantes y rechazo de trasplantes

25 **[0032]** La invención proporciona métodos para detectar y/o cuantificar los ácidos nucleicos libres de células en circulación, para el diagnóstico, pronóstico, detección y/o tratamiento de un estado de trasplante de corazón o resultado. Ha habido afirmaciones de detección de ADN de donante en pacientes con trasplante de hígado y riñón de sexo diferente; se utilizó PCR convencional para buscar secuencias del cromosoma Y de donantes masculinos en la sangre de pacientes femeninas (Lo, YM, et al., Lancet, 351, 1329-1330 (1998)). Sin embargo, en un estudio de seguimiento, las secuencias específicas del cromosoma Y no se detectaron por encima del fondo en 16 de 18
30 pacientes utilizando un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) más preciso. (Lui, YY, et al., Clin Chem, 49, 495-496 (2003)). En el trasplante renal, se analizaron muestras de orina de pacientes sometidos a trasplante de sexo similar y se detectó ADN cromosómico Y en pacientes inmediatamente después del trasplante, así como durante episodios de rechazo del injerto. (Zhang, J., et al., Clin Chem, 45, 1741-1746 (1999); Zhong, XY, et al., Ann NY Acad Sci, 945, 250-257 (2001)).

35 **[0033]** El Ejemplo 1 examinó receptores de trasplante de corazón con diferencias de género y PCR digital aplicada (Warren, L., Bryder, D., Weissman, IL, Quake, SR, Proc Natl Acad Sci, 103, 17807-17812 (2006); Fan, HC Quake, SR, Anal Chem, 79, 7576-7579 (2007)) para detectar el nivel de señal del cromosoma Y derivada del donante en muestras de plasma tomadas al mismo tiempo que una biopsia endomiocárdica determinó un episodio de rechazo de grado 3A o 3B. Si bien no se detectó ninguna señal de cromosoma Y significativa en cuatro pacientes de trasplante de control de mujer a mujer, se observó una fracción genómica total del 1,5-8% para las señales del cromosoma Y en los puntos de tiempo de rechazo para tres pacientes de trasplante de hombre a mujer en cuatro episodios de rechazo (Figura 2). Un estudio cronológico de uno de estos pacientes reveló que el nivel de cromosoma Y detectado en plasma era insignificante en el plasma tres meses antes del rechazo, pero aumentó >10 veces a 2% de la fracción genómica total en el momento en que una biopsia determinó el rechazo (Ver Figuras 3 y 4). En conjunto, estos resultados establecen que para los pacientes con trasplante de corazón, el ADN derivado del donante presente en el plasma puede servir como un marcador potencial para la aparición de insuficiencia orgánica.

50 **[0034]** Aunque cada uno de estos estudios demuestra ADN de donante en los fluidos corporales para diferentes trasplantes de órganos sólidos, todos ellos están limitados al caso especial de las hembras que reciben órganos de los machos y no funcionará para las hembras que reciben de las hembras, los machos que reciben de los machos, o machos que reciben de las hembras. Otros problemas con esta estrategia surgen de la prevalencia del microquimerismo en pacientes femeninas donde los embarazos masculinos anteriores o las transfusiones de sangre pueden conducir a señales específicas del cromosoma Y de fuentes distintas del órgano trasplantado (Hubacek, JA, Vymetalova, Y., Bohuslavova, R., Kocik, M., Malek, I., Transplant Proc, 39, 1593-1595 (2007); Vymetalova, Y., et al., Transplant Proc, 40, 3685-3687 (2008)). La detección de alelos del antígeno leucocitario humano (HLA) específico del donante en el ADN circulante se ha considerado como una señal de rechazo de órganos, específicamente para pacientes con trasplante de riñón y páncreas. (Gadi, VK, Nelson, JL, Boespflug, ND, Guthrie, KA, Kuhr, CS, Clin Chem, 52, 379-382 (2006)). Sin embargo, esta estrategia también estará limitada por la incapacidad de distinguir los alelos HLA entre todos donantes y receptores, en particular para los tipos comunes de HLA, y la posible complicación del microquimerismo, como las transfusiones de sangre (Baxter-Lowe, LA Busch, MP, Clin Chem, 52, 559-561 (2006)).

60 **[0035]** La invención proporciona un enfoque universal a la detección no invasiva del rechazo de injertos en pacientes de trasplante de corazón que elude los potenciales problemas de microquimerismo de ADN de otras fuentes extranjeras y es general para todos los receptores de trasplantes de corazón sin tener en cuenta el género. En algunas realizaciones, se genera una huella genética para el órgano donante. Este enfoque permite una identificación confiable

de secuencias que surgen únicamente del trasplante de órganos que se pueden realizar de una manera que es independiente de los géneros del donante y del receptor.

5 [0036] En algunas realizaciones, tanto el donante como el receptor serán genotipados antes del trasplante. Los ejemplos de métodos que pueden usarse para genotipar el donante de trasplante de corazón y el receptor de trasplante de corazón incluyen, pero no se limitan a, secuenciación del genoma completo, secuenciación del exoma o matrices de polimorfismos (por ejemplo, matrices SNP). Se establece un conjunto de SNP relevantes y distinguibles entre las dos fuentes.

10 [0037] Después del trasplante, fluidos corporales tales como sangre pueden extraerse del paciente y se analizaron para marcadores. Los ejemplos de fluidos corporales incluyen, pero no se limitan a, frotis, esputo, biopsias, secreciones, líquido cefalorraquídeo, bilis, sangre, líquido linfático, saliva y orina. Detección, identificación y/o cuantificación de los marcadores polimórficos específicos al donante (*es decir*, SNPs) se llevan a cabo usando secuenciación de alto rendimiento de ácidos nucleicos circulantes libres de células, tales como secuenciación de alto rendimiento rápida de ácidos nucleicos circulantes libres de células (por ejemplo, ADN libre de células). La proporción de ácidos nucleicos del donante se puede controlar a lo largo del tiempo y un aumento de esta proporción se puede utilizar para determinar el estado o el resultado del trasplante de corazón (por ejemplo, rechazo del trasplante).

20 [0038] Pueden ser utilizados marcadores polimórficos como se describió anteriormente, donde el trasplante es un xenotrasplante.

Muestras

25 [0039] Los métodos de la invención implican realizar uno o más análisis genético o etapas de detección en los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos diana son ácidos nucleicos circulantes libres de células de una muestra obtenida de un sujeto que ha recibido un trasplante de corazón. Dicho sujeto puede ser un ser humano o un animal domesticado como una vaca, pollo, cerdo, caballo, conejo, perro, gato o cabra. En algunas realizaciones, las células utilizadas para la genotipificación en los métodos de la presente invención se toman de un paciente. Las muestras derivadas de un animal, por ejemplo, un ser humano, pueden incluir, por ejemplo, sangre total, sudor, lágrimas, saliva, flujo del oído, esputo, linfa, suspensión de médula ósea, linfa, orina, saliva, semen, flujo vaginal, líquido cefalorraquídeo, líquido cerebral, ascitis, leche, secreciones del tracto respiratorio, intestinal o líquido genitourinario, un lavado de un tejido u órgano (p. ej. pulmón) o tejido que se ha extraído de órganos, como mama, pulmón, intestino, piel, cuello uterino, próstata, páncreas, corazón, hígado y estómago. Por ejemplo, una muestra de tejido puede comprender una región de células relacionadas funcionalmente o células adyacentes. Tales muestras pueden comprender poblaciones complejas de células, que pueden ensayarse como una población, o separarse en subpoblaciones. Estas muestras celulares y acelulares pueden separarse mediante centrifugación, elutriación, separación por gradiente de densidad, aféresis, selección por afinidad, cribado, FACS, centrifugación con Hypaque, etc. Mediante el uso de anticuerpos específicos para marcadores identificados con tipos de células particulares, una población de células relativamente homogénea puede obtenerse. Alternativamente, se puede utilizar una población celular heterogénea. Las células también se pueden separar mediante filtros. Por ejemplo, la sangre completa también se puede aplicar a filtros que están diseñados para contener tamaños de poros que seleccionan el tipo o clase celular deseada. Las células se pueden filtrar de la sangre completa diluida después de la lisis de los glóbulos rojos usando filtros con tamaños de poros entre 5 y 10 μm , como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. N^o 09/790.673. Otros dispositivos pueden separar las células del torrente sanguíneo, ver Demirci U, Toner M., Direct etch method for microfluidic channel and nanoheight post-fabrication by picoliter droplets, Applied Physics Letters 2006; 88 (5), 053117; e Irimia D, Geba D, Toner M., Universal microfluidic gradient generator, Analytical Chemistry 2006; 78: 3472-3477. Una vez que se obtiene una muestra, se puede usar directamente, congelar o mantener en un medio de cultivo apropiado durante cortos períodos de tiempo. Los métodos para aislar una o más células para su uso de acuerdo con los métodos de esta invención se realizan de acuerdo con técnicas y protocolos estándar bien establecidos en la técnica.

50 [0040] Para obtener una muestra de sangre, cualquier técnica conocida en la técnica puede ser utilizada, por ejemplo, una jeringa u otro dispositivo de succión al vacío. Opcionalmente, una muestra de sangre se puede pretratar o procesar antes del enriquecimiento. Ejemplos de pasos de pretratamiento incluyen la adición de un reactivo como un estabilizador, un conservante, un fijador, un reactivo de lisis, un diluyente, un reactivo antiapoptótico, un reactivo anticoagulante, un reactivo antitrombótico, reactivo regulador de propiedades magnéticas, reactivo de tampón, reactivo regulador de osmolalidad, reactivo regulador de pH y/o reactivo de reticulación.

60 [0041] Cuando se obtiene una muestra de sangre, un conservante tal como un agente anti-coagulación y/o un estabilizante se puede añadir a la muestra antes del enriquecimiento. Esto permite más tiempo para el análisis/detección. Por lo tanto, una muestra, como una muestra de sangre, se puede analizar con cualquiera de los métodos y sistemas de la presente en 1 semana, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, 1 día, 12 horas, 6 horas, 3 horas, 2 horas o 1 hora desde el momento en que se obtiene la muestra.

65 [0042] En algunas realizaciones, una muestra de sangre se puede combinar con un agente que lisa selectivamente una o más células o componentes en una muestra de sangre. Por ejemplo, las plaquetas y/o los glóbulos rojos enucleados se lisan selectivamente para generar una muestra enriquecida en células nucleadas. Las células de interés

se pueden separar posteriormente de la muestra usando métodos conocidos en la técnica.

[0043] Cuando la obtención de una muestra de un sujeto (por ejemplo, muestra de sangre), la cantidad puede variar dependiendo de tamaño del sujeto y la afección que se esté apantallado. En algunas realizaciones, se obtiene hasta 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 ml de una muestra. En algunas realizaciones, se obtienen 1-50, 2-40, 3-30 o 4-20 ml de muestra. En algunas realizaciones, más de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 ml de una muestra es adquirido.

Ácidos nucleicos

[0044] Los ácidos nucleicos a partir de muestras que pueden analizarse por los métodos en el presente documento incluyen: ADN bicatenario, ADN monocatenario, horquillas de una sola hebra de ADN, híbridos de ADN/ARN, ARN (por ejemplo ARNm o miARN) y horquillas de ARN. Los ejemplos de análisis genéticos que se pueden realizar en ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, secuenciación, detección de SNP, detección de STR, análisis de expresión de ARN y expresión génica.

[0045] En algunas realizaciones, menos de 1 pg, 5 pg, 10 pg, 20 pg, 30 pg, 40 pg, 50 pg, 100 pg, 200 pg, 500 pg, 1 ng, 5 ng, 10 ng, 20 ng, 30 ng, 40 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, 500 ng, 1ug, 5ug, 10 ug, 20 ug, 30 ug, 40 ug, 50 ug, 100 ug, 200 ug, 500 ug o 1 mg de ácidos nucleicos se obtienen de la muestra para su posterior análisis genético. En algunos casos, se obtienen aproximadamente 1-5 pg, 5-10 pg, 10-100 pg, 100 pg-1 ng, 1-5 ng, 5-10 ng, 10-100 ng, 100 ng-1ug de ácidos nucleicos de la muestra para su posterior análisis genético.

[0046] Se utilizan los métodos de la invención para detectar y/o cuantificar regiones de ADN genómicos que contienen un ADN polimorfismo, y en particular las regiones de ADN genómico que contiene polimorfismos de nucleótido único (SNPs). Un polimorfismo se refiere a la aparición de dos o más secuencias o alelos alternativos determinados genéticamente en una población. Un marcador o sitio polimórfico es el lugar en el que se produce la divergencia. Los marcadores preferidos tienen al menos dos alelos, cada uno de los cuales se presenta con una frecuencia preferiblemente superior al 1%, y más preferiblemente superior al 10% o 20% de una población seleccionada. Un polimorfismo puede comprender uno o más cambios de base, una inserción, una repetición o una delección. Un locus polimórfico puede ser tan pequeño como un par de bases. Los marcadores polimórficos incluyen polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), repeticiones cortas en tándem (STR), número variable de repeticiones en tándem (VNTR), regiones hipervariables, minisatélites, repeticiones de dinucleótidos, repeticiones de trinucleótidos, repeticiones de tetranucleótidos, repeticiones de secuencia simple y elementos de inserción como Alu. Un polimorfismo entre dos ácidos nucleicos puede ocurrir de forma natural o ser causado por la exposición o el contacto con productos químicos, enzimas u otros agentes, o la exposición a agentes que causan daño a los ácidos nucleicos, por ejemplo, radiación ultravioleta, mutágenos o carcinógenos.

[0047] En algunas realizaciones, el método de la invención se utiliza para detectar y/o cuantificar múltiples SNPs. En algunas realizaciones, el método de la invención analiza al menos 1; 2; 3; 4; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500; 1.000; 2.000; 5.000; 10.000; 20.000; 50.000; 100.000; 200.000; 300.000; 400.000; 500.000; 600.000; 700.000; 800.000; 900.000; 1.000.000; 2.000.000 o 3.000.000 SNPs diferentes.

[0048] En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se utilizan para diagnosticar o predecir el estado de trasplante de corazón o el resultado (por ejemplo, el rechazo de trasplantes). En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se utilizan para detectar y/o cuantificar ácidos nucleicos diana para determinar si un paciente o sujeto muestra tolerancia al trasplante de corazón. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se utilizan para detectar y/o cuantificar ácidos nucleicos diana para el diagnóstico o la predicción del rechazo de un trasplante de corazón. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se usan para detectar y/o cuantificar ácidos nucleicos diana para determinar un régimen inmunosupresor para un sujeto que ha recibido un trasplante de corazón, por ejemplo, un aloinjerto. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento se utilizan para detectar y/o cuantificar ácidos nucleicos diana para predecir la supervivencia del trasplante en un sujeto que ha recibido un trasplante de corazón. La invención proporciona métodos para diagnosticar o predecir si un trasplante en un paciente o sujeto trasplantado de corazón sobrevivirá o se perderá. En determinadas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se utilizan para detectar y/o cuantificar ácidos nucleicos diana para diagnosticar o predecir la presencia de supervivencia del injerto a largo plazo. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento se usan para detectar y/o cuantificar ácidos nucleicos diana para el diagnóstico o la predicción de una lesión por trasplante no basada en rechazo. Los ejemplos de lesión de injerto no basada en rechazo incluyen, pero no se limitan a, lesión isquémica, infección por virus, isquemia perioperatoria, lesión por reperfusión, hipertensión, estrés fisiológico, lesiones debidas a especies reactivas de oxígeno y lesiones causadas por agentes farmacéuticos.

[0049] Tal como se utiliza aquí, el término "diagnosticar" o "diagnóstico" de un estado de trasplante o el resultado incluye la predicción o diagnóstico de la situación de trasplante o resultado, la determinación de la predisposición a un estado de trasplante o resultado, el seguimiento de tratamiento de paciente de trasplante, el diagnóstico de una respuesta terapéutica del paciente trasplantado, y el pronóstico del estado o resultado del trasplante, la progresión del trasplante y la respuesta a un tratamiento particular.

Detección y análisis de ácidos nucleicos de órganos donantes

5 **[0050]** En algunas realizaciones, se utilizan los métodos para establecer un genotipo tanto para el donante como el receptor antes del trasplante para permitir la detección de ácidos nucleicos específicos del donante como el ADN o ARN en fluidos corporales tales como sangre u orina del receptor del órgano después del trasplante. Este enfoque permite una identificación confiable de secuencias que surgen únicamente del trasplante de órganos que se puede realizar de una manera que es independiente de los géneros del donante y el receptor.

10 **[0051]** En algunas realizaciones, una huella genética es generada para el órgano del donante. Tanto el donante como el receptor serán genotipados antes del trasplante. El genotipado de donantes y receptores de trasplantes establece un perfil, utilizando marcadores distinguibles, para detectar los ácidos nucleicos del donante (ácido nucleico libre de células circulantes).

15 **[0052]** Después del trasplante, las muestras como se ha descrito anteriormente se pueden extraer del paciente y se analizan para marcadores. La proporción de ácidos nucleicos del donante se puede controlar a lo largo del tiempo y un aumento de esta proporción se puede utilizar para determinar el estado o el resultado del trasplante de corazón (por ejemplo, rechazo del trasplante).

20 **[0053]** En algunas realizaciones, la genotipificación comprende la detección y cuantificación de ácidos nucleicos a partir de células del donante de trasplante de circulación o ácidos nucleicos circulantes libres de células. Los ejemplos de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, ADN bicatenario, ADN monocatenario, horquillas de ADN monocatenario, híbridos de ADN/ARN, ARN (por ejemplo, ARNm o miARN) y horquillas de ARN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ADN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ARN. Por ejemplo, el ARN libre de células también está presente en el plasma humano (Tong, YK Lo, YM, Clin Chim Acta, 363, 187-196 (2006)) y la secuenciación de ADNc de transcripciones específicas de órganos proporciona otra opción para detectar ácidos nucleicos de donantes específicos que surgen de las células del órgano trasplantado. En algunas realizaciones, se utilizan ácidos nucleicos recogidos de células circulantes en la sangre.

30 **[0054]** En algunas realizaciones, la genotipificación comprende la detección y cuantificación de los SNP. Sin pretender limitarse a ninguna teoría, cualquier donante y receptor variará en aproximadamente tres millones de posiciones de SNP si está completamente genotipado. Los SNP utilizables deben ser homocigotos para el receptor e idealmente homocigotos también para el donante. Si bien la mayoría de estas posiciones contendrán SNP que son heterocigotos para el donante o el receptor, más del 10% (o cientos de miles) serán homocigotos tanto para el donante como para el receptor, lo que significa que una lectura directa de esa posición de SNP puede distinguir el ADN del donante de ADN del receptor. Por ejemplo, después de genotipar un donante y un receptor de trasplante, utilizando plataformas de genotipado existentes conocidas en la técnica, incluida la descrita en el presente documento, se podrían identificar aproximadamente 1,2 millones de variaciones totales entre un donante y un receptor de trasplante. Los SNP utilizables pueden comprender aproximadamente 500.000 SNP de donantes heterocigotos y aproximadamente 160.000 SNP de donantes homocigotos. Las empresas (como Applied Biosystems, Inc.) ofrecen actualmente conjuntos de sondas TaqMan estándar y de diseño personalizado para el genotipado de SNP que, en principio, pueden apuntar a cualquier posición de SNP deseada para un ensayo basado en PCR (Livak, KL, Marmaro, J., Todd, JA, Nature Genetics, 9, 341-342 (1995); De La Vefa, FM, Lazaruk, KD, Rhodes, MD, Wenz, MH, Mutation Research, 573, 111-135 (2005)). Con un grupo tan grande de SNP potenciales para elegir, se puede seleccionar un subconjunto utilizable de sondas existentes o personalizadas para que sirva como el conjunto de sondas para cualquier par de donante/receptor. En algunas realizaciones, la secuenciación realizada en el ácido nucleico recuperado del plasma u otras muestras biológicas cuantificará directamente el porcentaje de especies específicas del donante observadas en la muestra.

50 **[0055]** Debido a la baja cantidad de lecturas esperadas por cualquier ácido nucleico individual (por ejemplo SNP) en muestras de pacientes, alguna preamplificación del material de muestra puede requerirse antes del análisis para aumentar los niveles de señal, pero utilizando la preamplificación, el muestreo de más posiciones de ácido nucleico diana (por ejemplo, posiciones de SNP), o ambos, proporcionará una lectura fiable de la fracción de ácido nucleico del donante de trasplante. La preamplificación se puede realizar utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, como la amplificación de desplazamiento múltiple (MDA) (Gonzalez et al. Environ Microbiol; 7 (7); 1024-8 (2005)) o la amplificación con cebadores externos en un enfoque de PCR anidado. Esto permite la detección y el análisis de ácidos nucleicos del donante incluso si la cantidad total de ácido nucleico del donante en la muestra (por ejemplo, sangre de un paciente trasplantado) es solo de 1 µg, 500 ng, 200 ng, 100 ng, 50 ng, 40 ng, 30 ng, 20 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng, 500 pg, 200 pg, 100 pg, 50 pg, 40 pg, 30 pg, 20 p, 10 pg, 5pg o 1 pg o entre 1 y 5 µg, 5 - 10 µg, o 10 - 50 µg.

60 **a. PCR**

65 **[0056]** La determinación del genotipo de los ácidos nucleicos del donante y del receptor puede realizarse mediante PCR. Ejemplos de técnicas de PCR que se pueden utilizar incluyen, entre otras, PCR cuantitativa, PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR), PCR fluorescente multiplex (MF-PCR), PCR en tiempo real (RTPCR), PCR de una sola célula, fragmento de restricción PCR de polimorfismo de longitud (PCR-RFLP), PCR-RFLP/RT-PCR-RFLP, PCR de inicio en caliente, PCR anidada, PCR de polononía in situ, amplificación de círculo rodante in situ (RCA), PCR en puente, PCR

de picotiter y PCR en emulsión. Otros métodos de amplificación adecuados incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación de la transcripción, la replicación de secuencia autosostenida, la amplificación selectiva de las secuencias de polinucleótidos diana, la reacción en cadena de la polimerasa cebada con secuencia consenso (CP-PCR), la reacción en cadena de la polimerasa cebada arbitrariamente (AP-PCR), PCR degenerada cebada con oligonucleótidos (DOP-PCR) y amplificación de secuencia basada en ácidos nucleicos (NABSA). Otros métodos de amplificación que pueden usarse para amplificar loci polimórficos específicos incluyen los descritos en la patente de EE.UU. N^{os} 5.242.794, 5.494.810, 4.988.617 y 6.582.938.

b. Secuenciación

[0057] La genotipificación de los ácidos nucleicos del donante y del receptor, y/o la detección, identificación y/o cuantificación de los ácidos nucleicos específicos del donante después del trasplante (por ejemplo, marcadores polimórficos tales como SNP) se puede realizar mediante secuenciación tal como secuenciación del genoma completo o secuenciación de exoma. La secuenciación se puede lograr mediante métodos de secuenciación clásicos de Sanger que son bien conocidos en la técnica. La secuenciación también se puede lograr usando sistemas de alto rendimiento, algunos de los cuales permiten la detección de un nucleótido secuenciado inmediatamente después o tras su incorporación en una hebra en crecimiento, es decir, detección de la secuencia en tiempo rojo o sustancialmente en tiempo real. En algunos casos, la secuenciación de alto rendimiento genera al menos 1.000, al menos 5.000, al menos 10.000, al menos 20.000, al menos 30.000, al menos 40.000, al menos 50.000, al menos 100.000 o al menos 500.000 lecturas de secuencia por hora; siendo cada lectura al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 120 o al menos 150 bases por lectura. La secuenciación se puede realizar utilizando los ácidos nucleicos descritos en este documento, tales como ADN genómico, ADNc derivado de transcripciones de ARN o ARN como plantilla.

[0058] En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de la tecnología disponible por Helicos BioSciences Corporation (Cambridge, Massachusetts), como la secuenciación de molécula única por método de síntesis (SMSS). SMSS es único porque permite secuenciar todo el genoma humano sin necesidad de un paso de preamplificación. Por tanto, se reducen la distorsión y la no linealidad en la medición de ácidos nucleicos. Este método de secuenciación también permite la detección de un nucleótido SNP en una secuencia sustancialmente en tiempo real o en tiempo real. Finalmente, como se mencionó anteriormente, SMSS es poderoso porque, como la tecnología MIP, no requiere un paso de preamplificación antes de la hibridación. De hecho, SMSS no requiere ninguna amplificación. SMSS se describe en parte en la Solicitud de Publicación de EE.UU. N^o 2006002471 I; 20060024678; 20060012793; 20060012784; y 20050100932.

[0059] En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento implica el uso de la tecnología disponible por 454 Lifesciences, Inc. (Branford, Connecticut), tal como el dispositivo de la placa Pico Titer que incluye una placa de fibra óptica que transmite la señal quimioluminiscente generada por la reacción de secuenciación a ser registrada por una cámara CCD en el instrumento. Este uso de fibra óptica permite la detección de un mínimo de 20 millones de pares de bases en 4,5 horas.

[0060] Los métodos para usar la amplificación de perlas seguida de detección de fibra óptica se describen en Marguiles, M., et al. "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors", Nature, doi: 10.1038/nature03959; y así como en las Solicitudes de Publicación de EE.UU. N^{os} 200200 12930; 20030058629; 20030 1001 02; 20030 148344; 20040248 161; 200500795 10, 20050 124022; y 20060078909.

[0061] En algunas realizaciones, la secuenciación de alto rendimiento se realiza utilizando Clonal Single Molecule Array (Solexa, Inc.) o secuenciación por síntesis (SBS) utilizando la química de terminador reversible. Estas tecnologías se describen en parte en las patentes de EE.UU. N^{os} 6,969,488; 6,897,023; 6,833,246; 6,787,308; y las Solicitudes de Publicación de EE.UU. N^{os} 200401061 30; 20030064398; 20030022207; y Constans, A., The Scientist 2003, 17(13): 36.

[0062] En algunas realizaciones de este aspecto, la secuenciación de alto rendimiento de ARN o de ADN puede tener lugar usando AnyDot.chips (Genovox, Alemania), que permite el seguimiento de los procesos biológicos (por ejemplo, la expresión de miARN o variabilidad de alelos (detección de SNP). En particular, los chips AnyDot permiten una mejora de 10 a 50 veces la detección de señales de fluorescencia de nucleótidos. Los chips AnyDot y los métodos para usarlos se describen en parte en las Solicitudes de Publicación Internacional N^{os} WO 02088382, WO 03020968, WO 0303 1947, WO 2005044836, PCTEP 05105657, PCMEP 05105655; y Solicitudes de Patente Alemana N^{os} DE 101 49786, DE 102 14 395, DE 103 56 837, DE 10 2004009 704, DE 10 2004 025 696, DE 10 2004 025 746, DE 10 2004 025 694, DE 10 2004 025 695, DE 10 2004 025 744, DE 10 2004 025 745 y DE 10 2005 012 301.

[0063] Otros sistemas de secuenciación de alto rendimiento incluyen los descritos en Venter, J., et al. Science 16 de febrero de 2001; Adams, M. et al, Science 24 de marzo de 2000; y M. J, Levene y col. Science 299: 682-686, enero de 2003; así como la Solicitud de Publicación de EE.UU. N^o 20030044781 y 2006/0078937. En general, dicho sistema implica secuenciar una molécula de ácido nucleico diana que tiene una pluralidad de bases mediante la adición temporal de bases mediante una reacción de polimerización que se mide en una molécula de ácido nucleico, es decir, la actividad de una enzima polimerizadora de ácido nucleico en la plantilla. La molécula de ácido nucleico que se va a

secuenciar se sigue en tiempo real. La secuencia se puede deducir luego identificando qué base se está incorporando en la hebra complementaria en crecimiento del ácido nucleico diana mediante la actividad catalítica de la enzima polimerizadora del ácido nucleico en cada paso de la secuencia de adiciones de bases. Se proporciona una polimerasa en el complejo de la molécula de ácido nucleico diana en una posición adecuada para moverse a lo largo de la molécula de ácido nucleico diana y extender el cebador oligonucleotídico en un sitio activo. Se proporciona una pluralidad de tipos marcados de análogos de nucleótidos cerca del sitio activo, siendo cada tipo distinguible de análogo de nucleótidos complementario a un nucleótido diferente en la secuencia de ácido nucleico diana. La cadena de ácido nucleico en crecimiento se extiende usando la polimerasa para agregar un análogo de nucleótido a la cadena de ácido nucleico en el sitio activo, donde el análogo de nucleótido que se agrega es complementario al nucleótido del ácido nucleico diana en el sitio activo. Se identifica el análogo de nucleótido añadido al cebador oligonucleotídico como resultado de la etapa de polimerización. Los pasos de proporcionar análogos de nucleótidos marcados, polimerizar la cadena de ácido nucleico en crecimiento e identificar el análogo de nucleótido añadido se repiten para que la cadena de ácido nucleico se extienda más y se determine la secuencia del ácido nucleico diana.

[0064] En algunas realizaciones, se realiza la secuenciación rápida. En la secuenciación rápida, el ADN se divide aleatoriamente en numerosos segmentos pequeños, que se secuencian utilizando el método de terminación de cadena para obtener lecturas. Se obtienen múltiples lecturas superpuestas para el ADN diana realizando varias rondas de esta fragmentación y secuenciación. Los programas informáticos luego usan los extremos superpuestos de diferentes lecturas para ensamblarlos en una secuencia continua.

[0065] La invención proporciona métodos para diagnosticar, predecir o monitorear el estado o resultado del trasplante que comprenden la detección y cuantificación de SNP usando secuenciación. En este caso, se puede estimar la sensibilidad de detección. La sensibilidad tiene dos componentes: (i) el número de moléculas analizadas (profundidad de secuenciación) y (ii) la tasa de error del proceso de secuenciación. Con respecto a la profundidad de la secuenciación, una estimación frecuente de la variación entre individuos es que difiere alrededor de una base por mil. Actualmente, secuenciadores como Illumina Genome Analyzer tienen longitudes de lectura que superan los 36 pares de bases. Sin pretender limitarse a ninguna teoría o realización específica, esto significa que aproximadamente una de cada 30 moléculas analizadas tendrá un SNP potencial. Si bien la fracción de ADN del donante en la sangre del receptor no está bien determinada actualmente y dependerá del tipo de órgano, se puede tomar el 1% como una estimación de referencia basada en la literatura y los estudios propios de los solicitantes con pacientes con trasplante de corazón. En esta fracción de ADN del donante, aproximadamente una de cada 3.000 moléculas analizadas será del donante e informativa sobre el genotipo del donante. En el Genome Analyzer se pueden obtener aproximadamente 10 millones de moléculas por canal de análisis y hay 8 canales de análisis por ejecución del instrumento. Por lo tanto, si se carga una muestra por canal, se deberían poder detectar alrededor de 3.000 moléculas que se pueden identificar como del donante en origen, más que suficiente para hacer una determinación precisa de la fracción de ADN del donante utilizando los parámetros anteriores. Si se desea establecer un límite inferior de sensibilidad para este método requiriendo que se detecten al menos 100 moléculas donantes, entonces debería tener una sensibilidad capaz de detectar moléculas donantes cuando la fracción donante sea tan baja como 0,03%. Se puede lograr una mayor sensibilidad simplemente secuenciando más moléculas, es decir, usando más canales.

[0066] La tasa de error de secuenciación también afecta a la sensibilidad de esta técnica. Para una tasa de error promedio de ϵ , la probabilidad de que un único SNP sea identificado accidentalmente como de origen donante como resultado de una lectura incorrecta es aproximadamente $\epsilon/3$. Para cada lectura individual, esto establece un límite inferior de sensibilidad de la capacidad para determinar si la lectura se debe al donante o al receptor. Las tasas de error de secuenciación típicas para las sustituciones de bases varían entre plataformas, pero se encuentran entre el 0,5% y el 1,5%. Esto coloca un límite potencial a la sensibilidad del 0,16 al 0,50%. Sin embargo, es posible reducir sistemáticamente la tasa de error de secuenciación volviendo a secuenciar la plantilla de muestra varias veces, como ha demostrado Helicos BioSciences (Harris, TD, et al., Science, 320, 106-109 (2008)). Una sola aplicación de resecuenciación reduciría la tasa de error esperada de la detección de SNP de donantes a $\epsilon^2/9$ o menos de 0,003%.

[0067] La figura 5 muestra una estrategia general para controlar a todos los pacientes trasplantados (es decir, no solo a pacientes femeninas que reciben órganos masculinos), para determinar el estado o resultado de un trasplante. El genotipado del donante y el receptor puede establecer un perfil de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) para detectar el ADN del donante. La secuenciación rápida de ADN libre de células en plasma, con análisis de SNP únicos observados, permite la cuantificación del % de ADN del donante. Si bien cualquier SNP puede ser difícil de detectar con tan poco ADN en el plasma, con cientos de miles o más señales a considerar, debería ser posible una alta sensibilidad.

c. Matrices

[0068] La genotipificación de ácidos nucleicos del donante y del receptor puede realizarse usando matrices (por ejemplo, matrices de SNP). Los resultados se pueden visualizar mediante un escáner que permite ver la intensidad de los datos recopilados y el software para detectar y cuantificar el ácido nucleico. Tales métodos se describen en parte de la Patente de EE.UU. N° 6.505.125. Otro método contemplado por la presente invención para detectar y cuantificar ácidos nucleicos implica el uso de perlas que están disponibles comercialmente en Illumina, Inc. (San Diego) y que se describen en las patentes de EE.UU. N°s 7.035.740; 7033.754; 7.025.935. 6.998.274; 6.942.968;

6.913.884; 6.890.764; 6.890.741; 6.858.394; 6.812.005; 6.770.441; 6.620.584; G.544.732; 6.429.027; 6.396.995; 6.355.431 y las solicitudes de publicación de EE.UU. N^{os} 20060019258; 0050266432; 20050244870; 20050216207; 20050181394; 20050164246; 20040224353; 20040185482; 20030198573; 20030175773; 20030003490; 20020187515; y 20020177141; y en B. E. Stranger, et al., Public Library of Science-Genetics, 1 (6), diciembre de 2005; Jingli Cai, et al., Stem Cells, publicado en línea el 17 de noviembre de 2005; CM Schwartz, y col., Stem Cells and Development, f 4, 517-534, 2005; Barnes, M., J. et al., Nucleic Acids Research, 33 (1 81), 5914-5923, octubre de 2005; y Bibikova M, et al. Clinical Chemistry, Volumen 50, N^o 12, 2384-2386, diciembre de 2004. Additional description for preparing RNA for bead arrays is described in Kacharina JE, et al., Methods Enzymol 303: 3-18, 1999; Pabon C, et al., Biotechniques 31 (4): 8769,2001; Van Gelder RN, et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 87:.. 1663-7 (1990); y Murray, SS BMC Genetics B(Suppl): SX5 (2005).

[0069] Al analizar SNPs de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, los ácidos nucleicos del donante y/o receptor del trasplante se pueden etiquetar e hibridar con una micromatriz de ADN (por ejemplo, una matriz de conjuntos de 100 K u otra matriz). Los resultados se pueden visualizar utilizando un escáner que permite ver la intensidad de los datos recopilados y el software "llama" al SNP presente en cada una de las posiciones analizadas. Se describen métodos implementados por ordenador para determinar el genotipo usando matrices de mapeo de h m de datos, por ejemplo, en Liu, et al., Bioinformatics 19: 2397-2403,2003; y Di et al., Bioinformatics 21: 1958-63, 2005. Los métodos implementados por ordenador para el análisis de enlaces que utilizan datos de matriz de mapeo se describen, por ejemplo, en Ruschendorf y Nusnberg, Bioinformatics 21: 2123-5,2005; y Leykin et al., BMC Genet. 6: 7, 2005; y en la Patente de EE.UU. N^o 5.733.729.

[0070] En algunos casos de tales métodos, la genotipificación de micromatrices que se utilizan para detectar SNPs se puede utilizar en combinación con la inversión de sondas moleculares (MIPS) como se describe en Hardenbol et al., Genome Res. 15 (2): 269-275, 2005, Hardenbol, P. et al. Nature Biotechnology 21 (6), 673-8, 2003; Faham M y col. Hum Mol Genet. 1 de agosto; 10 (16): 1657-64,2001; Maneesh Jain, Ph.D., et al. Genetic Engineering News V24: N^o 18, 2004; y Fakhrai-Rad H, et al. Genome Res. Jul; 14 (7): 1404-12, 2004; y en la patente de EE.UU. N^o 5.858.412. Las matrices de etiquetas universales y los kits de reactivos para realizar tal genotipado específico de locus utilizando paneles de MIP personalizados están disponibles en Affymetrix y ParAllele. La tecnología MIP implica el uso de reacciones enzimológicas que pueden puntuar hasta 10,000: 20,000, 50,000; 100.000; 200.000; 500.000; 1.000.000; 2.000.000 o 5.000.000 de SNP (ácidos nucleicos diana) en un solo ensayo. Las reacciones enzimológicas son insensibles a la reactividad cruzada entre múltiples moléculas de sonda y no hay necesidad de preamplificación antes de la hibridación de la sonda con el ADN genómico. En cualquiera de los métodos, el (los) ácido(s) nucleico(s) diana o SNP se pueden obtener de una sola célula.

[0071] Otro método contemplado por la presente invención para detectar ácidos nucleicos diana implica el uso de matrices de perlas (por ejemplo, como uno disponible comercialmente por Illumina, Inc.) como se describe en la Patente de EE.UU. N^{os} 7.040.959; 7.035.740; 7033.754; 7.025.935. 6.998.274; 6.942.968; 6.913.884; 6.890.764; 6.890.741; 6.858.394; 6.846.460; 6.812.005; 6.770.441; 6.663.832; 5.520.584; 6.544.732; 6.429.027; 6.396.995; 6.355.431 m d Solicitudes de Publicación de EE.UU. N^{os} 20060019258; 20050266432; 20050244870; 20050216207; 20050181394; 20050164246; 20040224353; 20040185482; 20030198573; 200301 75773; 20030003490; 200201 8751 5; y 20020177141; como así como Shen, R., et al. Mutation Research 573 70 - 82 (2005).

Métodos

[0072] La invención proporciona métodos para diagnosticar, predecir o controlar el estado o resultado del trasplante en un sujeto que ha recibido un trasplante de corazón. El estado o resultado del trasplante puede comprender rechazo, tolerancia, lesión del trasplante sin rechazo, función del trasplante, supervivencia del trasplante, lesión crónica del trasplante o inmunosupresión farmacológica del título. Los ejemplos de lesión de aloinjerto no basada en rechazo incluyen, pero no se limitan a lesión isquémica, infección por virus, isquemia perioperatoria, lesión por reperfusión, hipertensión, estrés fisiológico, lesiones debidas a especies reactivas de oxígeno y lesiones causadas por agentes farmacéuticos. El estado o resultado del trasplante puede comprender complicaciones vasculares o afectación neoplásica del órgano trasplantado.

[0073] En algunas realizaciones, se utilizan los métodos de la invención para establecer un genotipo tanto para el donante como el receptor antes del trasplante. En algunas realizaciones, la genotipificación tanto del donante como del receptor antes del trasplante permite la detección de ácidos nucleicos específicos del donante, como ADN o ARN, en fluidos corporales como se describe en este documento (por ejemplo, sangre u orina) del receptor del órgano después del trasplante. En algunas realizaciones, se determina un perfil de marcador para el donante basándose en el genotipado del donante de trasplante. En algunas realizaciones, se determina un perfil de marcador para el receptor del trasplante basándose en el genotipado del receptor del trasplante. En algunas realizaciones, se establece un perfil de marcador seleccionando marcadores que se distinguen entre el donante de trasplante y el sujeto que recibe el trasplante.

[0074] Este enfoque permite una identificación confiable de los ácidos nucleicos que surgen únicamente del trasplante de órganos que se puede realizar de una manera que es independiente de los géneros del donante y el receptor.

- 5 **[0075]** La genotipificación del donante de trasplante y/o del receptor de trasplante puede realizarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluidos los descritos en el presente documento, tales como secuenciación, matriz de ácido nucleico o PCR. En algunas realizaciones, la genotipificación del donante del trasplante y/o del receptor del trasplante se realiza mediante secuenciación rápida. En algunas realizaciones, la genotipificación del donante de trasplante y/o el receptor de trasplante se realiza utilizando una matriz de ADN. En algunas realizaciones, la genotipificación del donante del trasplante y/o del receptor del trasplante se realiza usando una matriz de polimorfismos como una matriz de SNP.
- 10 **[0075]** El perfil de marcador polimórfico de la invención comprende uno o más SNPs. En algunas realizaciones, el perfil de marcador comprende al menos 1; 2; 3; 4; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500; 1.000; 2.000; 5.000; 10.000; 20.000; 50.000; 100.000; 200.000; 300.000; 400.000; 500.000; 600.000; 700.000; 800.000; 900.000; 1.000.000; 2.000.000 o 3.000.000 SNPs diferentes.
- 15 **[0076]** Después del trasplante, las muestras como se ha descrito anteriormente se puede extraer del paciente y se analiza para la presencia o ausencia de uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células del donante de trasplante. En algunas realizaciones, la muestra es sangre, plasma, suero u orina. La proporción y/o cantidad de ácidos nucleicos circulantes libres de células del donante se puede controlar a lo largo del tiempo y se puede usar un aumento en esta proporción para determinar el estado o resultado del trasplante (por ejemplo, rechazo del trasplante).
- 20 **[0077]** En la invención reivindicada, la presencia o ausencia de uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células del donante del trasplante en el receptor del trasplante se determinó por secuenciación de alto rendimiento. En algunas realizaciones, la presencia o ausencia de uno o más ácidos nucleicos del donante del trasplante en el receptor del trasplante se determina mediante secuenciación rápida de alto rendimiento.
- 25 **[0078]** Pueden también ser utilizados marcadores polimórficos como se describió anteriormente, donde el trasplante es un xenotrasplante.
- 30 **[0079]** En la invención reivindicada, la presencia o ausencia de ADN circulante libre de células o ARN libre de células de un donante de trasplante en un receptor de trasplante se utiliza para determinar el estado de trasplante o resultado. El ADN puede ser ADN bicatenario, ADN monocatenario, horquillas de ADN monocatenario o ADNc. El ARN puede ser ARN monocatenario o horquillas de ARN. En algunas realizaciones, la presencia o ausencia de híbridos de ADN/ARN circulantes de un donante de trasplante en un receptor de trasplante se usa para determinar el estado o resultado del trasplante. En algunas realizaciones, la presencia o ausencia de ARNm circulante de un donante de trasplante en un receptor de trasplante se usa para determinar el estado o resultado del trasplante. En algunas realizaciones, la presencia o ausencia de ADN circulante de un donante de trasplante en un receptor de trasplante se usa para determinar el estado o resultado del trasplante. En algunas realizaciones, se usa ADNc para determinar el estado o resultado del trasplante.
- 35 **[0080]** En algunas realizaciones, el método de la invención comprende la determinación de si un paciente o sujeto está mostrando la tolerancia del trasplante. En algunas realizaciones, el método de la invención comprende el diagnóstico o la predicción del rechazo del trasplante. El término "rechazo de trasplantes" abarca el rechazo de trasplantes tanto agudo como crónico. En algunas realizaciones, el método de la invención incluye además determinar un régimen inmunosupresor para un sujeto que ha recibido un trasplante, por ejemplo, un aloinjerto. En algunas realizaciones, el método de la invención incluye además determinar la eficacia de un régimen inmunosupresor para un sujeto que ha recibido un trasplante de corazón. Ciertas realizaciones del método de la invención comprenden predecir la supervivencia del trasplante en un sujeto que ha recibido un trasplante de corazón. El método de la invención puede comprender diagnosticar o predecir si un trasplante de corazón en un paciente o sujeto trasplantado sobrevivirá o se perderá. En determinadas realizaciones, el método de la invención comprende diagnosticar o predecir la presencia de supervivencia del injerto a largo plazo. En algunas realizaciones, el método de la invención comprende el diagnóstico o la predicción de una lesión por trasplante no basada en rechazo. Los ejemplos de lesión de injerto no basada en rechazo incluyen, pero no se limitan a, lesión isquémica, infección por virus, isquemia perioperatoria, lesión por reperfusión, hipertensión, estrés fisiológico, lesiones debidas a especies reactivas de oxígeno y lesiones causadas por agentes farmacéuticos. En algunas realizaciones, el método de la invención comprende el diagnóstico o la predicción de complicaciones vasculares o afectación neoplásica del órgano trasplantado.
- 40 **[0081]** En algunas realizaciones, la cantidad de uno o es más ácidos nucleicos circulantes libres de células del donante de trasplante en una muestra de receptor del trasplante utilizan para determinar el estado de trasplante o resultado. Por tanto, en algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden además cuantificar uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra donante se determina como un porcentaje del total de ácidos nucleicos en la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra donante se determina como una proporción de los ácidos nucleicos totales en la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra del donante se determina como una relación o porcentaje en comparación con uno o más ácidos nucleicos de referencia en la muestra. Por ejemplo, se puede determinar que la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante es el 10% del total de ácidos nucleicos de la muestra. Alternativamente, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante puede estar en una proporción de 1:10 en comparación con los ácidos nucleicos
- 45 **[0081]** En algunas realizaciones, la cantidad de uno o es más ácidos nucleicos circulantes libres de células del donante de trasplante en una muestra de receptor del trasplante utilizan para determinar el estado de trasplante o resultado. Por tanto, en algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden además cuantificar uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra donante se determina como un porcentaje del total de ácidos nucleicos en la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra donante se determina como una proporción de los ácidos nucleicos totales en la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra del donante se determina como una relación o porcentaje en comparación con uno o más ácidos nucleicos de referencia en la muestra. Por ejemplo, se puede determinar que la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante es el 10% del total de ácidos nucleicos de la muestra. Alternativamente, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante puede estar en una proporción de 1:10 en comparación con los ácidos nucleicos
- 50 **[0081]** En algunas realizaciones, la cantidad de uno o es más ácidos nucleicos circulantes libres de células del donante de trasplante en una muestra de receptor del trasplante utilizan para determinar el estado de trasplante o resultado. Por tanto, en algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden además cuantificar uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra donante se determina como un porcentaje del total de ácidos nucleicos en la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra donante se determina como una proporción de los ácidos nucleicos totales en la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra del donante se determina como una relación o porcentaje en comparación con uno o más ácidos nucleicos de referencia en la muestra. Por ejemplo, se puede determinar que la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante es el 10% del total de ácidos nucleicos de la muestra. Alternativamente, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante puede estar en una proporción de 1:10 en comparación con los ácidos nucleicos
- 55 **[0081]** En algunas realizaciones, la cantidad de uno o es más ácidos nucleicos circulantes libres de células del donante de trasplante en una muestra de receptor del trasplante utilizan para determinar el estado de trasplante o resultado. Por tanto, en algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden además cuantificar uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra donante se determina como un porcentaje del total de ácidos nucleicos en la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra donante se determina como una proporción de los ácidos nucleicos totales en la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra del donante se determina como una relación o porcentaje en comparación con uno o más ácidos nucleicos de referencia en la muestra. Por ejemplo, se puede determinar que la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante es el 10% del total de ácidos nucleicos de la muestra. Alternativamente, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante puede estar en una proporción de 1:10 en comparación con los ácidos nucleicos
- 60 **[0081]** En algunas realizaciones, la cantidad de uno o es más ácidos nucleicos circulantes libres de células del donante de trasplante en una muestra de receptor del trasplante utilizan para determinar el estado de trasplante o resultado. Por tanto, en algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden además cuantificar uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra donante se determina como un porcentaje del total de ácidos nucleicos en la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra donante se determina como una proporción de los ácidos nucleicos totales en la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra del donante se determina como una relación o porcentaje en comparación con uno o más ácidos nucleicos de referencia en la muestra. Por ejemplo, se puede determinar que la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante es el 10% del total de ácidos nucleicos de la muestra. Alternativamente, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante puede estar en una proporción de 1:10 en comparación con los ácidos nucleicos
- 65 **[0081]** En algunas realizaciones, la cantidad de uno o es más ácidos nucleicos circulantes libres de células del donante de trasplante en una muestra de receptor del trasplante utilizan para determinar el estado de trasplante o resultado. Por tanto, en algunas realizaciones, los métodos de la invención comprenden además cuantificar uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra donante se determina como un porcentaje del total de ácidos nucleicos en la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra donante se determina como una proporción de los ácidos nucleicos totales en la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra del donante se determina como una relación o porcentaje en comparación con uno o más ácidos nucleicos de referencia en la muestra. Por ejemplo, se puede determinar que la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante es el 10% del total de ácidos nucleicos de la muestra. Alternativamente, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante puede estar en una proporción de 1:10 en comparación con los ácidos nucleicos

5 totales de la muestra. Además, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante se puede determinar en un 10% o en una proporción de 1:10 de un gen de referencia tal como β -globina. En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante se puede determinar como concentración. Por ejemplo, se puede determinar que la cantidad de uno o más ácidos nucleicos de la muestra del donante es de 1 ug/ml.

10 [0082] En algunas realizaciones, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células del donante de trasplante por encima de un valor umbral predeterminado es indicativo de un estado de trasplante o resultado. Por ejemplo, se pueden determinar los valores normativos para pacientes post-trasplante clínicamente estables sin evidencia de rechazo del injerto u otras patologías. Un aumento en la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante del trasplante por encima de los valores normativos para los pacientes post-trasplante clínicamente estables podría indicar un cambio en el estado o resultado del trasplante, como el rechazo del trasplante o la lesión del trasplante. Por otro lado, una cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante por debajo o en los valores normativos para pacientes post-trasplante clínicamente estables podría indicar tolerancia al injerto o supervivencia del injerto.

20 [0083] En algunas realizaciones, diferentes valores de umbral predeterminados son indicativos de diferentes resultados del trasplante o de estado. Por ejemplo, como se discutió anteriormente, un aumento en la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante por encima de los valores normativos para pacientes post-trasplante clínicamente estables podría indicar un cambio en el estado o resultado del trasplante, como rechazo del trasplante o lesión del trasplante. Sin embargo, un aumento en la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante por encima de los valores normativos para pacientes post-trasplante clínicamente estables pero por debajo de un nivel de umbral predeterminado podría indicar una afección menos grave, como una infección viral, en lugar del rechazo del trasplante. Un aumento en la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante del trasplante por encima de un umbral más alto podría indicar el rechazo del trasplante.

30 [0084] En algunas realizaciones, las diferencias temporales en la cantidad de dichos uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante son indicativas de un estado de trasplante o resultado. Por ejemplo, un paciente trasplantado puede monitorizarse a lo largo del tiempo para determinar la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante trasplantado. Un aumento temporal en la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante del trasplante, que posteriormente vuelven a los valores normales, podría indicar una afección menos grave en lugar del rechazo del trasplante. Por otro lado, un aumento sostenido en la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante del trasplante podría indicar una afección grave, como el rechazo del trasplante.

35 [0085] En algunas realizaciones, las diferencias temporales en la cantidad de dichos uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante se pueden utilizar para monitorear la efectividad de un tratamiento inmunosupresor o para seleccionar un tratamiento inmunosupresor. Por ejemplo, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante se puede determinar antes y después de un tratamiento inmunosupresor. Una disminución en uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante después del tratamiento puede indicar que el tratamiento tuvo éxito en la prevención del rechazo del trasplante. Además, la cantidad de uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante se puede usar para elegir entre tratamientos inmunosupresores, por ejemplo, tratamientos inmunosupresores de diferentes concentraciones. Por ejemplo, una cantidad mayor en uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante puede indicar que existe la necesidad de un inmunosupresor muy potente, mientras que una cantidad menor en uno o más ácidos nucleicos del donante de trasplante puede indicar que un inmunosupresor menos potente puede ser usado.

50 [0086] La invención proporciona métodos que son sensibles y específicos. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento para diagnosticar o predecir el estado o resultado del trasplante tienen al menos 56%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% de sensibilidad. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento tienen al menos un 56% de sensibilidad. En algunas realizaciones, los métodos descritos aquí tienen al menos un 78% de sensibilidad. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento tienen una especificidad de aproximadamente un 70% a aproximadamente un 100%. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento tienen una especificidad de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 100%. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento tienen una especificidad de aproximadamente 90% a aproximadamente 100%. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento tienen una especificidad de aproximadamente el 100%.

60 [0087] También se describen aquí métodos para la detección y la identificación de marcadores que reconocen un ácido nucleico del donante que puede ser útil en los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, diagnosticar o predecir el estado de trasplante o resultado. En algunas realizaciones, el ácido nucleico del donante es ADN libre de células o ADN aislado de las células del donante circulantes.

65 [0088] El ácido nucleico donante que puede ser identificado por los métodos descritos aquí, incluyendo los métodos descritos en los Ejemplos. Después de identificarlos, se pueden observar los ácidos nucleicos del donante y examinar su correlación con el estado del trasplante y los resultados, como la lesión crónica del injerto, el rechazo y la tolerancia. En algunas realizaciones, se estudia el cambio longitudinal de los ácidos nucleicos del donante. Si son clínicamente

significativos, estos niveles podrían seguirse para valorar la inmunosupresión farmacológica o podrían estudiarse como una diana para el agotamiento.

Kits

5 [0089] También se describen reactivos y kits de los mismos para la práctica de uno o más de los métodos anteriormente descritos. Los reactivos diana y los kits de los mismos pueden variar mucho. Los reactivos de interés incluyen reactivos diseñados específicamente para su uso en la producción de lo anteriormente descrito: (i) genotipado de un donante de trasplante y un receptor de trasplante; (ii) identificación de perfiles de marcadores; y (ii) detección y/o cuantificación de uno o más ácidos nucleicos de un donante de trasplante en una muestra obtenida de un receptor de trasplante.

15 [0090] Un tipo de tales reactivos son una o más sondas o una matriz de sondas con el genotipo y/o para detectar y/o para cuantificar uno o más ácidos nucleicos. Se conocen en la técnica una variedad de diferentes formatos de matriz, con una amplia variedad de diferentes estructuras de sonda, composiciones de sustrato y tecnologías de unión.

20 [0091] Los kits según la invención pueden incluir las matrices descritas anteriormente. Dichos kits pueden comprender adicionalmente uno o más agentes terapéuticos. El kit puede comprender además un paquete de software para el análisis de datos, que puede incluir perfiles de referencia para compararlos con el perfil de prueba.

25 [0092] Los kits pueden comprender reactivos tales como tampones, y H₂O. Los kits pueden comprender reactivos necesarios para llevar a cabo la extracción de ácido nucleico y/o detección de ácido nucleico utilizando los métodos descritos en el presente documento tal como la PCR y secuenciación.

30 [0093] Dichos kits también pueden incluir información, como referencias de la literatura científica, materiales del inserto de embalaje, resultados de ensayos clínicos, y/o resúmenes de estos y similares, que indican o establecen las actividades y/o ventajas de la composición, y/o que describen la dosificación, la administración, los efectos secundarios, las interacciones farmacológicas u otra información útil para el proveedor de atención médica. Dichos kits también pueden incluir instrucciones para acceder a una base de datos. Dicha información puede basarse en los resultados de varios estudios, por ejemplo, estudios con animales de experimentación que incluyan modelos in vivo y estudios basados en ensayos clínicos en humanos. Los kits descritos en el presente documento se pueden proporcionar, comercializar y/o promocionar a proveedores de servicios de salud, incluidos médicos, enfermeros, farmacéuticos, funcionarios del formulario y similares. Los kits también pueden, en algunas realizaciones, comercializarse directamente al consumidor.

Programa de ordenador

40 [0094] Cualquiera de los métodos anteriores puede ser realizado por un producto de programa informático que comprende un ordenador lógico ejecutable que se registraron en un medio legible por ordenador. Por ejemplo, el programa de computadora puede ejecutar algunas o todas las funciones siguientes: (i) controlar el aislamiento de ácidos nucleicos de una muestra, (ii) preamplificar ácidos nucleicos de la muestra, (iii) amplificar, secuenciar u ordenar regiones polimórficas específicas en la muestra, (iv) identificar y cuantificar un perfil de marcador en la muestra, (v) comparar datos sobre el perfil de marcador detectado de la muestra con un umbral predeterminado, (vi) determinar un estado o resultado de trasplante, (vi) declarar estado o resultado normal o anormal del trasplante. En particular, la lógica ejecutable por ordenador puede analizar datos sobre la detección y cantidad de polimorfismo(s) (por ejemplo, SNP).

50 [0095] La lógica ejecutable por ordenador puede trabajar en cualquier equipo que puede ser cualquiera de una variedad de tipos de computadoras de propósito general tales como un ordenador personal, servidor de red, estaciones de trabajo, u otra plataforma de ordenador ahora o desarrollada más tarde. En algunas realizaciones, se describe un producto de programa informático que comprende un medio utilizable por ordenador que tiene la lógica ejecutable por ordenador (programa de software de ordenador, incluido el código de programa) almacenada en el mismo. La lógica ejecutable por ordenador puede ser ejecutada por un procesador, haciendo que el procesador realice las funciones descritas en este documento. En otras realizaciones, algunas funciones se implementan principalmente en hardware usando, por ejemplo, una máquina de estado de hardware. La implementación de la máquina de estado de hardware para realizar las funciones descritas en este documento será evidente para los expertos en las técnicas relevantes.

60 [0096] El programa puede proporcionar un método de evaluación de un estado de trasplante o resultado en un receptor de trasplante mediante el acceso a datos que reflejan la determinación del genotipo del donante de trasplante y el paciente de trasplante, y/o la presencia o ausencia de uno o más ácidos nucleicos a partir del donante trasplantado en la circulación del paciente trasplantado después del trasplante.

65 [0097] En un caso, el ordenador que ejecuta la lógica del ordenador también puede incluir un dispositivo de entrada digital, como un escáner. El dispositivo de entrada digital puede proporcionar información sobre un ácido nucleico, por ejemplo, niveles/cantidad de polimorfismo. Por ejemplo, un escáner puede proporcionar una imagen del polimorfismo (por ejemplo, SNP) según el método de la presente. Por ejemplo, un escáner puede proporcionar una imagen

detectando emisiones fluorescentes, radiactivas o de otro tipo; detectando radiación transmitida, reflejada o dispersa; detectando propiedades electromagnéticas u otras características; o por otras técnicas. Los datos detectados se almacenan normalmente en un dispositivo de memoria en forma de archivo de datos. En un caso, un escáner puede identificar uno o más objetivos etiquetados. Por ejemplo, un primer polimorfismo de ADN puede marcarse con un primer tinte que emite fluorescencia a una frecuencia característica particular, o banda estrecha de frecuencias, en respuesta a una fuente de excitación de una frecuencia particular. Un segundo polimorfismo de ADN puede marcarse con un segundo tinte que emite fluorescencia a una frecuencia característica diferente. Las fuentes de excitación para el segundo tinte pueden tener, pero no es necesario, una frecuencia de excitación diferente a la fuente que excita al primer tinte, por ejemplo, las fuentes de excitación podrían ser los mismos o diferentes láseres.

[0098] En algunos casos, la presente descripción incluye un medio legible por ordenador que comprende un conjunto de instrucciones grabadas sobre el mismo para causar que un ordenador realice las etapas de (i) recibir datos de uno o más ácidos nucleicos detectado en una muestra de un sujeto que ha recibido un trasplante de un donante, en el que dichos uno o más ácidos nucleicos son ácidos nucleicos de dicho donante trasplantado, y en donde dichos uno o más ácidos nucleicos de dicho donante se identifican basándose en un perfil de marcador predeterminado; y (ii) diagnosticar o predecir el estado o resultado del trasplante basándose en la presencia o ausencia del uno o más ácidos nucleicos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Detección de ADN del donante en receptores de trasplante de órganos

[0099] Usando PCR digital como se describe antes (Warren, L., Bryder, D., Weissman, IL, Quake, SR, Proc Natl Acad Sci, 103, 17807-17812 (2006); Fan, HC Quake, SR, Anal Chem, 79, 7576-7579 (2007)), la cantidad de marcadores de cromosoma Y y cromosoma 1 se cuantificaron para pacientes femeninas que recibieron corazones masculinos o femeninos en muestras de plasma tomadas al mismo tiempo que una biopsia endomiocárdica determinaba un episodio de rechazo de grado 3A o 3B.

[0100] Mientras que las transfusiones de sangre/nacimiento de niño varón son mecanismos conocidos para tener firma cY detectable en una paciente, la Figura 2 muestra que los niveles generales de cY son uniformemente más altos para los pacientes que reciben corazones de donantes masculinos. No se detectó una señal significativa del cromosoma Y de cuatro pacientes de trasplante de control de mujer a mujer. Por otro lado, se observó una fracción genómica total del 1,5-8% para las señales del cromosoma Y en los puntos de tiempo de rechazo para tres pacientes de trasplante de hombre a mujer en cuatro episodios de rechazo.

[0101] Los niveles de cromosoma Y en plasma se controlaron a varios puntos de tiempo después del trasplante para algunos de estos pacientes, y se compararon con puntos de tiempo de biopsia para el rechazo de órganos. Para el paciente 6, se detectó un rechazo de grado 3A después de la biopsia 21 meses después del trasplante. El nivel de cromosoma Y detectado en plasma fue insignificante en el plasma tres meses antes del rechazo, pero aumentó >10 veces al 2% de la fracción genómica total en el momento en que una biopsia determinó el rechazo. En este momento se observan los niveles más altos de cY en el ADN plasmático (Figura 3). Los resultados de la Figura 3 sugieren que los niveles generales de ADN libre de células en el plasma no son diagnósticos de insuficiencia orgánica y no siguen la señal de ADN "específica del donante".

[0102] Se observaron tendencias similares para otro paciente que tenía niveles Cy creciendo a los 5 meses después del trasplante, cuando una biopsia detecta un rechazo de grado 3A (Figura 4). El porcentaje de ADN cY (o % de "donante") aumenta antes y es más alto en el momento del rechazo. Al igual que antes, la cantidad de ADN libre de células total no parece ser un diagnóstico de rechazo cardíaco.

[0103] En conjunto, estos resultados establecen que para los pacientes con trasplante de corazón, el ADN derivado del donante presente en el plasma puede servir como un marcador potencial para la aparición de insuficiencia orgánica.

Ejemplo 2: Genotipado de donante de trasplante y receptor de trasplante

[0104] La figura 5 muestra una estrategia general para controlar a todos los pacientes de trasplante. El genotipado del donante y el receptor puede establecer un perfil de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) para detectar el ADN del donante. La secuenciación rápida de ADN libre de células en plasma, con análisis de SNP únicos observados, permite la cuantificación del % de ADN del donante en la muestra. Mientras que cualquier SNP único puede ser difícil de detectar con tan poco ADN en plasma, con cientos de miles o más señales a considerar, debería ser posible alta sensibilidad.

[0105] Las bibliotecas de genotipos mixtos pueden ser creadas utilizando dos líneas CEU (Mormon, Utah) HapMap. Aproximadamente 1,2 millones de variaciones totales entre estos dos individuos ya se establecieron utilizando plataformas de genotipado existentes (por ejemplo, Illumina Golden Gate). Los SNP utilizables deben ser homocigotos para el receptor e idealmente homocigotos también para el donante. Los SNP utilizables comprenden: (i)

aproximadamente 500.000 donantes heterocigotos SNP (el recuento será la mitad de la fracción total del donante), (ii) aproximadamente 160.000 SNP de donantes homocigotos.

- 5 **[0106]** *Resultados de secuenciación:* 4 carriles de secuenciación Illumina se utilizan para comparar 4 niveles diferentes de sustitución de ADN donante en ADN receptora (véase la Figura 6). La tasa de error de secuenciación es actualmente ~ 0,3-0,5% para sustitución de bases. El uso de puntuaciones de calidad para mejorar el filtrado de llamadas SNP, o el uso de resecuenciación, debería reducir la tasa de error y aumentar la sensibilidad. El uso de más ubicaciones de SNP (de genotipado completo) también debería mejorar el rendimiento de la señal sin cambios en el protocolo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar, predecir o monitorear el estado o resultado del trasplante que comprende:
 - 5 determinar, en una muestra de un sujeto que ha recibido un trasplante de órgano sólido de un donante, la presencia o ausencia de uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células del trasplante de órganos sólidos del donante, en donde uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células son regiones de ADN genómico que contienen polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), en los que uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células del trasplante de órganos sólidos del donante se identifican basándose en un
 - 10 perfil de marcador predeterminado, en donde dicho perfil de marcador es un perfil de marcador polimórfico y dicho perfil de marcador polimórfico comprende uno o más polimorfismos de nucleótido único (SNP), y en donde se determina la presencia o ausencia de dicho uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células por secuenciación de alto rendimiento de múltiples ácidos nucleicos libres de células diferentes de la muestra; y diagnosticar, predecir o monitorizar el estado o resultado del trasplante basándose en la presencia o
 - 15 ausencia del uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células del trasplante de órgano sólido del donante, en donde el trasplante de órgano sólido es un trasplante de corazón.
 2. El método de la reivindicación 1, en donde el método se utiliza para detectar y/o cuantificar múltiples SNPs.
 - 20 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el método analiza al menos 1; 2; 3; 4; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500; 1.000; 2.000; 5.000; 10.000; 20.000; 50.000; 100.000; 200.000; 300.000; 400.000; 500.000; 600.000; 700.000; 800.000; 900.000; 1.000.000; 2.000.000 o 3.000.000 SNPs diferentes.
 - 25 4. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el perfil de marcador comprende al menos 1; 2; 3; 4; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500; 1.000; 2.000; 5.000; 10.000; 20.000; 50.000; 100.000; 200.000; 300.000; 400.000; 500.000; 600.000; 700.000; 800.000; 900.000; 1.000.000; 2.000.000 o 3.000.000 SNPs diferentes.
 5. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la muestra es sangre o suero.
 - 30 6. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende además cuantificar el uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células.
 7. El método de la reivindicación 1, en donde la secuenciación de alto rendimiento es secuenciación rápida.
 - 35 8. El método de la reivindicación 1, que comprende además determinar un régimen inmunosupresor para tratar o prevenir el rechazo del trasplante.
 9. El método de la reivindicación 1, en donde diagnosticar, predecir o monitorizar el estado o resultado del trasplante comprende predecir el resultado o estado del trasplante en un sujeto.
 - 40 10. El método de la reivindicación 1, que comprende además elegir entre tratamientos inmunosupresores, tales como tratamientos inmunosupresores de diferentes concentraciones.
 - 45 11. El método de la reivindicación 1, en donde los múltiples ácidos nucleicos diana diferentes de la muestra no se preamplifican antes de la secuenciación.
 12. El método de la reivindicación 1, en donde dicho perfil de marcador se determina genotipando dicho donante de trasplante.
 - 50 13. El método de la reivindicación 12, que comprende además genotipar dicho sujeto que recibe dicho trasplante.
 14. El método de la reivindicación 13, que comprende además establecer un perfil de SNP, en donde dichos SNP son distinguibles entre dicho donante de trasplante y dicho sujeto que recibe dicho trasplante.
 - 55 15. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto es homocigoto para el SNP.
 16. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto es un ser humano.
 - 60 17. El método de la reivindicación 1, en donde el trasplante de órgano sólido es un aloinjerto.
 18. El método de la reivindicación 1, en donde el estado o resultado del trasplante comprende rechazo, tolerancia, lesión del aloinjerto no basada en rechazo, función del trasplante, supervivencia del trasplante, lesión crónica del trasplante o inmunosupresión farmacológica del título.
 - 65 19. El método de la reivindicación 1, en donde una cantidad del uno o más ácidos nucleicos circulantes libres de células del trasplante de órgano sólido de donante por encima de un valor umbral predeterminado es indicativa de un

estado o resultado de trasplante.

20. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra es una muestra de plasma.

5 **21.** El método de la reivindicación 1, en donde la muestra es una muestra de orina.

Figura 1

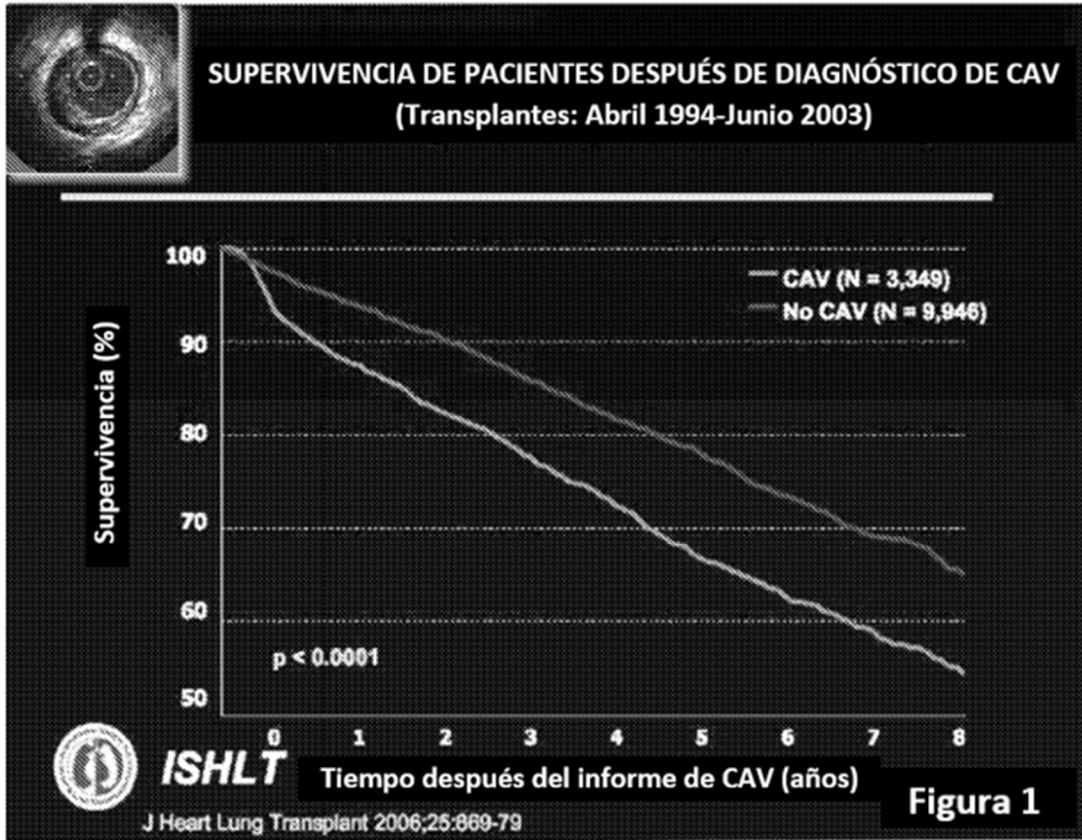


Figura 2

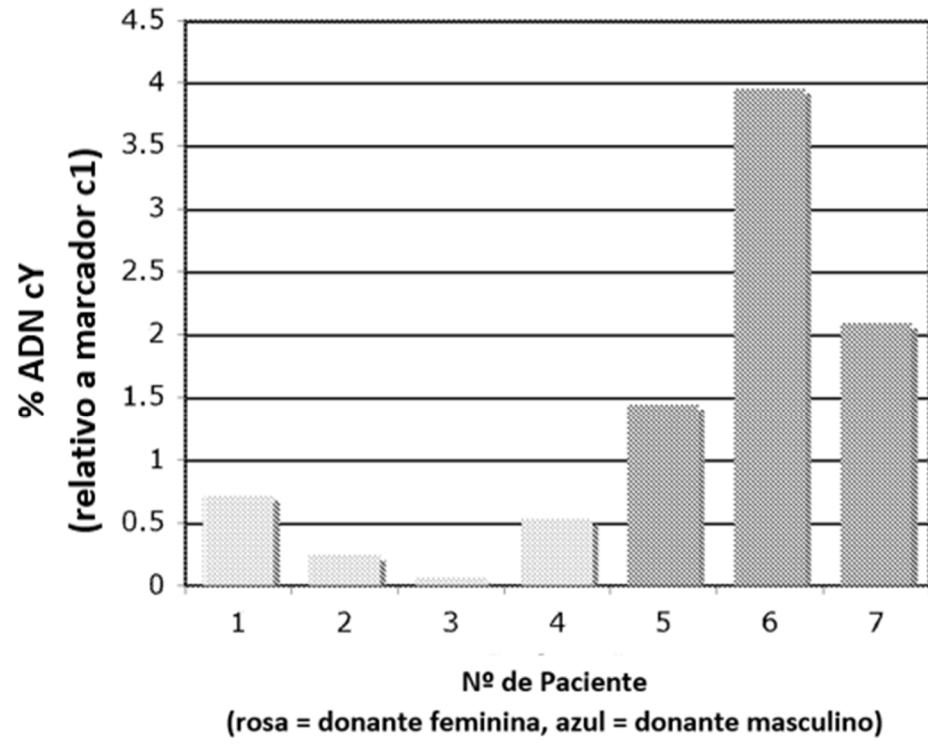


Figura 3

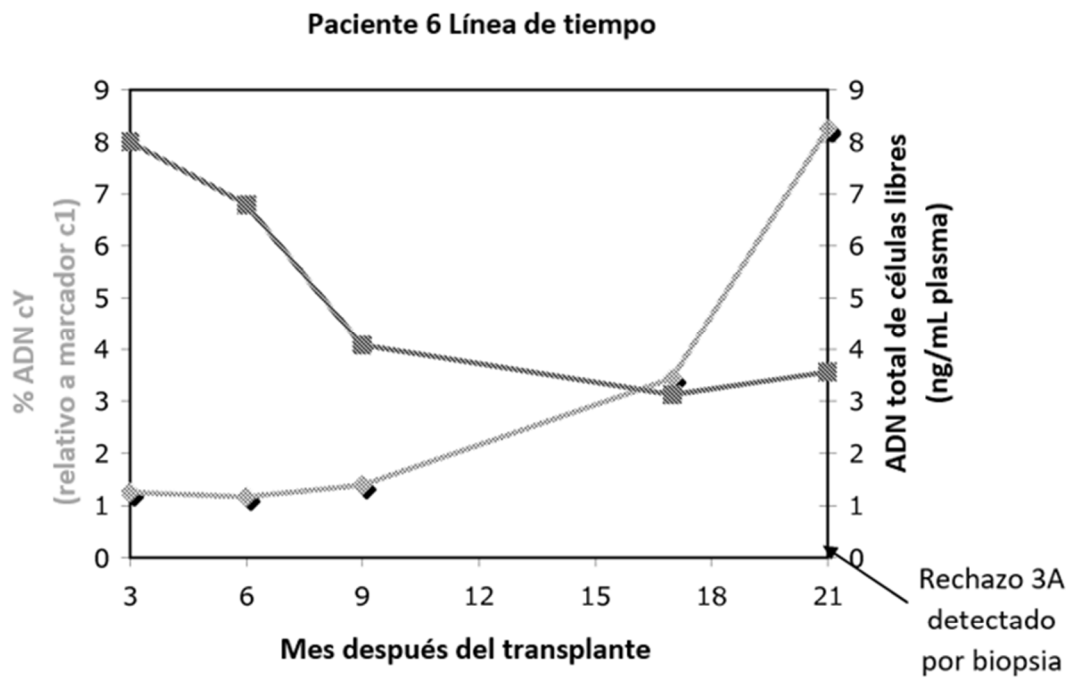


Figura 4

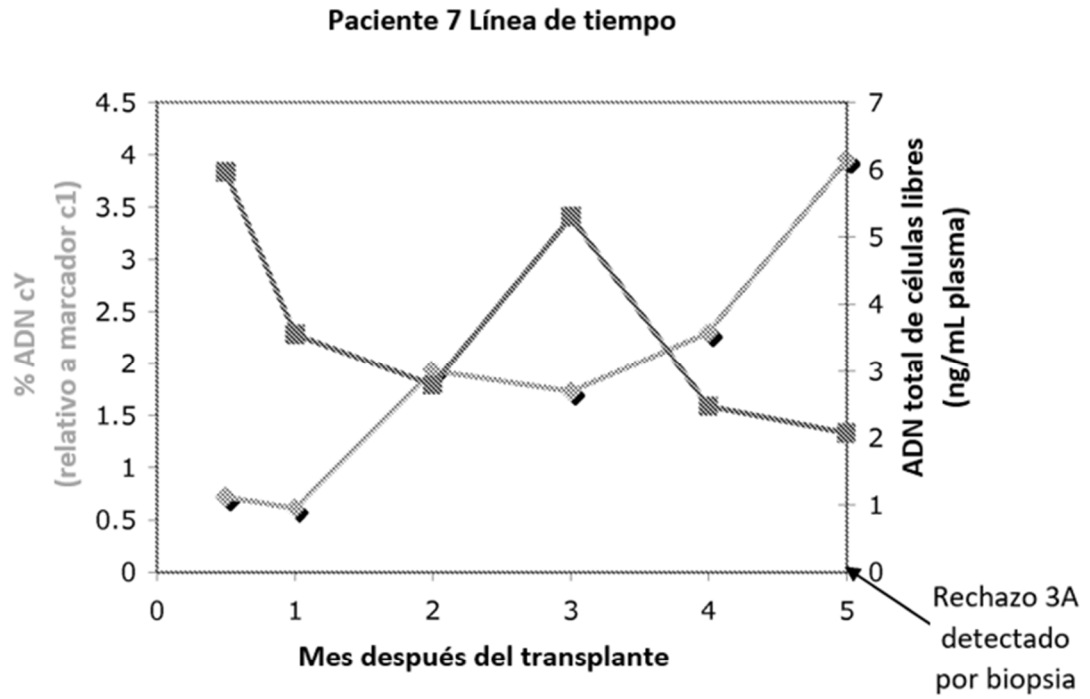


Figura 6

A.

Biblioteca	0% Donante	1% Donante	3% Donante	10% Donante
Lecturas alineadas únicas totales	8747074	9340382	5444089	8485355
Total c/ SNPs	80301	84525	40161	71286
Nº Homo para Recep.	19882	20571	9269	15367
Nº Homo para Donante	77	133	360	1936

B.

