

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 856 211**

51 Int. Cl.:

A61P 13/12 (2006.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2014** **PCT/US2014/022607**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014** **WO14159227**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2014** **E 14773719 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2020** **EP 2968989**

54 Título: **Uso de SHROOM3 como marcador para la nefropatía crónica del aloinjerto**

30 Prioridad:

12.03.2013 US 201361777328 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
27.09.2021

73 Titular/es:

**ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI
(100.0%)
One Gustave L. Levy Place Box 1030
New York, NY 10029, US**

72 Inventor/es:

**MURPHY, BARBARA y
HE, CIJIANG**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 856 211 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

Uso de SHROOM3 como marcador para la nefropatía crónica del aloinjerto

- 5 El gobierno de Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre esta invención en virtud de los fondos recibidos de la subvención N.º 1U01AI070107-01 de los Institutos nacionales de salud.

Campo de la invención

- 10 La presente invención pertenece a los métodos para identificar pacientes que sufren de enfermedades renales.

Antecedentes de la invención

- 15 La enfermedad renal crónica (ERC, en inglés, CKD) afecta al 10 % de los adultos estadounidenses con una incidencia y una prevalencia crecientes a nivel mundial {Coresh J, 2007}. La enfermedad renal en etapa terminal (ERET; en inglés, ESRD) requiere terapia de reemplazo renal (TRR; en inglés, RRT) y afecta actualmente a más de 500.000 adultos estadounidenses. Además de conferir riesgo de enfermedad renal en etapa terminal (ERET), la ERC aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular y mortalidad por todas las causas {Weiner D, 2004}. La fibrosis tubulointersticial (FIT; en inglés, TIF) es un proceso patogénico común final para la ERC a partir de diversas etiologías que conducen al desarrollo de la ERET. FTI también es un componente principal de la nefropatía crónica del aloinjerto (CAN; del inglés, chronic allograft nephropathy) y se asocia con una disminución progresiva de la tasa de filtración glomerular estimada (TFGe; en inglés, eGFR) en el aloinjerto renal {Chapman J, 2005} {Nankivell BJ, 2003}. CAN representa la causa más común de pérdida de injerto a largo plazo censurada por las muertes y se mide histológicamente mediante la puntuación del índice de disfunción crónica del aloinjerto (puntuación CADI; del inglés, chronic allograft dysfunction index score) {Isoniemi H, 1992} {Yilmaz S, 2007}. Hasta la fecha, no existe una terapia antifibrótica eficaz para prevenir la progresión de ERC o CAN. Actualmente, algunos pacientes con ERC o CAN progresarán con el tiempo a ERET y necesitarán TRR. Por ejemplo, los receptores de aloinjertos renales representaron un 13,5 % de los pacientes en la lista de espera de trasplantes de riñón y un 15 % de todos los trasplantes realizados en 2005 {Magee JC, 2007}. Los receptores de aloinjertos renales tienen un 30 % de probabilidad de requerir TRR o un nuevo trasplante a los 10 años {RDS de EE.UU. 2012}. La atención de RRT y ERET es una carga financiera desproporcionada y creciente para el Medicare {Iglehart, 2011}. Por tanto, es fundamental identificar nuevos biomarcadores sensibles para predecir el desarrollo de la fibrosis renal. Además, estos marcadores podrían representar dianas para la intervención terapéutica para prevenir el desarrollo de FTI en una etapa temprana, evitando así la progresión a ERET.

- 35 Los estudios basados en biopsias de aloinjertos (tanto por causa como por protocolo) han proporcionado la comprensión de cómo los cambios tempranos del aloinjerto se correlacionan con los desenlaces de los aloinjertos a largo plazo {Gago M, 2012} {Rush D, 1994} {Seron D, 1997} {Cosio F, 2005} {Park W, 2010}. Más recientemente, los distintivos de las biopsias y del perfil de expresión génica (transcriptoma) sanguíneo han demostrado que clasifican a los pacientes con rechazo agudo, rechazo crónico, los que reciben inmunosupresión y los receptores operativamente tolerantes {Akalin E, 2010} {Akalin E, 2001} {Flechner S, 2004} {Donauer J, 2003} {Sarwal M, 2003} {Reeve J, 2009} {Scherer A, 2003} {Sagoo P, 2010} {Newell K, 2010}. Estos paneles génicos han podido mejorar con clasificadores histológicos solo {Sarwal M, 2003} {Reeve J, 2009}. Los estudios de asociación del genoma completo han unido fuertemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP; del inglés, single-nucleotide polymorphism) en el gen Shroom3 (rs17319721) con ERC incidente y prevalente mediante TFGe en cohortes poblacionales de ascendencia europea {Kottgen A, 2009} {Böger C, 2011}. El gen Shroom3 codifica una proteína que contiene el dominio PDZ que puede unirse directamente a la F-actina y regular su distribución subcelular en las células. La ausencia completa o defectuosa de Shroom3 causa defectos de tubo neural abierto y muerte neonatal en ratones {Hildebrand J, 1999}. En las líneas celulares de riñón MDCK, Shroom3 se localiza en los complejos apical y de unión y es crítico para el mantenimiento del fenotipo de células epiteliales normales {Hildebrand J, 2005}. Se sabe también que el dominio C-terminal de Shroom3 interactúa con las Rho quinasas (ROCK) para facilitar la fosforilación de la miosina y la contracción de la actina {Nishimura T, 2008}. Sin embargo, aún se desconoce si Shroom3 juega un papel en la fibrosis renal en ERC o en CAN.

- 55 Lo que se necesita en la técnica son marcadores cuya expresión pueda utilizarse para identificar pacientes que padecen enfermedades renales y predecir el desarrollo de fibrosis renal. Además, tales marcadores se necesitan para identificar los receptores de aloinjertos renales que están en riesgo de desarrollar CAN y representan dianas para la intervención terapéutica para prevenir el desarrollo de FTI en una etapa temprana, evitando así la progresión a ERET.

60

Sumario de la invención

- La invención se define mediante el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Shroom3 es un nuevo gen candidato cuya expresión en un aloinjerto renal precede y predice la disminución de la función renal y FTI. Unos niveles más altos de Shroom3 de aloinjerto predicen la progresión histológica de CAN. También se ha encontrado que estas relaciones se correlacionan mejor en los receptores de riñones de donantes blancos. Los hallazgos confirman por

primera vez que el locus de Shroom3 (rs17319721) asociado a la enfermedad renal crónica (ERC) descrito anteriormente {Kottgen A, 2009} {Böger C, 2011} media su efecto a través de la expresión de Shroom3 aumentada. Además, se ha descubierto que Shroom3 tiene un papel beneficioso en la señalización canónica de TGF-beta y en la producción de colágeno-1.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar el riesgo de desarrollar nefropatía crónica del aloinjerto (CAN) en un paciente que ha recibido un trasplante de riñón de un donante que comprende identificar la raza del donante de riñón; determinar los niveles de expresión de SHROOM 3 en un espécimen de biopsia de riñón obtenido del paciente en un momento predeterminado después del trasplante; comparar el nivel de
10 expresión de SHROOM 3 en el espécimen de biopsia con los niveles de expresión de SHROOM en un control; determinar si el nivel de expresión de SHROOM 3 en el aloinjerto es significativamente mayor que en el control y diagnosticar que el paciente está en riesgo de CAN si el nivel de expresión de SHROOM 3 en el espécimen es significativamente mayor que en el control y el donante de riñón es caucásico.

15 Se divulga adicionalmente un método para identificar el riesgo de desarrollar nefropatía crónica del aloinjerto (CAN) en un paciente que ha recibido un riñón de un donante que comprende las etapas de identificar la raza del donante de riñón; obtener una muestra de biopsia del aloinjerto renal del paciente; determinar los niveles de expresión de SHROOM3 en dicha biopsia; comparar los niveles de expresión de SHROOM3 en dicha biopsia con los niveles de expresión de SHROOM3 en un control y advertir al paciente de que está en riesgo de desarrollar CAN si
20 los niveles de SHROOM3 en la muestra son significativamente mayores que en el control y el donante de riñón es caucásico.

Se divulga adicionalmente un método para identificar el riesgo de desarrollar una enfermedad renal en un paciente caucásico que ha recibido un riñón de un donante, que comprende las etapas para determinar si dicho donante
25 expresa el alelo de riesgo de SNP de rs 17319721 y realizar un análisis genético para determinar si dicho donante es homocigoto para dicho alelo de riesgo, donde si dicho donante es homocigoto para dicho alelo de riesgo, a continuación, dicho paciente está en riesgo de desarrollar una enfermedad renal.

Se divulga adicionalmente un método para identificar el riesgo de desarrollar fibrosis en un donante de riñón caucásico, que comprende las etapas para determinar si dicho donante expresa el alelo de riesgo de SNP de rs
30 17319721 y realizar un análisis genético para determinar si dicho donante es homocigoto para dicho alelo de riesgo; donde si dicho donante es homocigoto para dicho alelo de riesgo, a continuación, dicho paciente está en riesgo de fibrosis.

35 Se describe adicionalmente un método para identificar el riesgo de desarrollar una enfermedad renal progresiva seleccionada del grupo que consiste en nefropatía crónica del aloinjerto (CAN) y enfermedad renal crónica (ERC) de un paciente caucásico que comprende: determinar los niveles de expresión de SHROOM 3 en un espécimen de biopsia de riñón obtenido del paciente en un momento predeterminado, comparar el nivel de expresión de SHROOM
40 3 en el espécimen de biopsia con los niveles de expresión de SHROOM 3 en un control, determinar si el nivel de expresión de SHROOM 3 en el espécimen es significativamente mayor que en el control y diagnosticar que el paciente está en riesgo de dicha enfermedad si el nivel de expresión de SHROOM 3 en el espécimen es significativamente mayor que en el control.

Se describe adicionalmente un kit para identificar pacientes que padecen una enfermedad renal y en riesgo de
45 desarrollar CAN o ERC que comprende cebadores en recipientes separados para usar en ensayos de RT-PCR para la expresión de SHROOM3, RT-PCR para detectar el alelo de riesgo de SNP de rs 17319721, un control positivo, tampones e instrucciones de uso. Estos y otros aspectos de la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia a la luz de la presente descripción, reivindicaciones y dibujos.

50 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: un diagrama que muestra el número de participantes en el estudio notificado en el presente documento y que muestra que 160 participantes tenían ARN de biopsia de aloinjerto de 3 meses extraído para micromatrices. Entre estos 160 pacientes, a los 12 meses después del trasplante, 147 tenían notificada
55 creatinina de TFGe, 101 tenían CADI-12 y 85 tenían CADI-3 y -12.

Figuras 2A-2D: gráficos que representan (2A) la correlación del log de la expresión de Shroom3 del aloinjerto (micromatriz) a los 3 meses y la creatinina de TFGe a los 12 meses ($r=-0,20$; $p=0,007$); (2B) la correlación del log de la expresión de Shroom3 del aloinjerto (micromatriz) a los 3 meses y 12 meses de CADI (R de Pearson 0,22; $p=0,027$); (2C) La expresión de Shroom3 fue mayor en todos los donantes con fibrosis progresiva (Delta CADI = 2 o más; $n=17$) frente a aquellos sin progresión significativa (Delta CADI <2; $n=68$); y (2D) la correlación entre la expresión de Shroom3 a los 3 meses fue más fuerte en los riñones de donantes fallecidos y el CADI a los 12 meses ($r=0,34$; $p=0,0088$) [La línea representa la media; Bigotes=DT].
60

Figuras 3A-3D: gráficos que representan (3A) la correlación del factor de cambio de la expresión de Shroom3 (RT-PCR) a los 3 meses y 12 meses de CADI (r de Pearson = 0,4169; $p=0,0103$); (3B) la correlación del factor
65

de cambio de la expresión de Shroom3 (RT-PCR) a los 3 meses y la creatinina de TFGe a los 12 meses ($r=0,3230$; $p=0,0008$); y (3D) la recta de regresión de la relación entre el log de la expresión de Shroom3 a los 3 meses y la puntuación CADI simultánea - No se pudo identificar ninguna relación

Figuras 4A-4C: gráficos que representan (4A) la correlación del log de la expresión de Shroom3 del aloinjerto a los 3 meses y 12 meses de CADI en receptores de riñones de donantes blancos ($r=0,2538$; $p=0,02$); (4B) la correlación del log de la expresión de Shroom3 del aloinjerto respecto a la creatinina de TFGe en receptores de riñones de donantes blancos ($r=-0,25$; $p=0,008$); y (4C) el log de la expresión de Shroom3 fue más elevada en RRDB (receptores de riñón de donantes blancos; en inglés, WDKRs) con progresión de fibrosis (Delta CADI ≥ 2 ; $n=14$) que aquellos sin progresión significativa (Delta CADI <2 ; $n=56$) [$*p<0,05$; $**p<0,001$; $***p<0,0001$]

Figuras 5A-5C: gráficos que muestran que (5A) no hay correlación entre el log de la expresión de Shroom3 del aloinjerto (microarray) a los 3 meses y CADI a los 12 meses en los receptores de donantes vivos (RDV; en inglés, LDR) y: (5B) en los no RRDB; (5C) No hay correlación entre Shroom3 de 3 meses y TFGe-12m en no RRDB.

Figuras 6A-6B: gráficos que ilustran que (6A) el SNP de Shroom3 (rs17319721) se distribuye de manera diferente entre blancos y no blancos (tanto entre donantes como entre receptores). Los blancos tienen una mayor prevalencia del alelo de efecto ($p<0,0001$) (6B): La homocigosidad del alelo de riesgo en los riñones de donantes se asocia con una expresión de Shroom3 del aloinjerto aumentada significativamente ($p=0,033$) bigotes: percentil 5-95; línea en la mediana; $p=0,0183$) [$*p<0,05$; $**p<0,001$; $***p<0,0001$]

Figuras 7A-7C: gráficos que ilustran que (7A, 7B, respectivamente) la expresión de Shroom3 se incrementó tanto en RRDB como en no RRDB con la presencia del alelo de efecto (A) en el donante y (7C) la expresión de Shroom3 no se vio afectada significativamente por el tipo de SNP del receptor (bigotes: Mín-Máx; línea en la mediana; $p=0,0309$) [$*p<0,05$; $**p<0,001$; $***p<0,0001$]

Figuras 8A-8B: gráficos que ilustran (8A) prevalencia alélica del SNP de Shroom3 en 354 receptores blancos (como %) según la etiología de ERET. Los receptores con ERET por diabetes (DM) (49 %) tuvieron la prevalencia alélica de riesgo significativamente mayor en comparación con donantes no emparentados. (8B): Prevalencia alélica del SNP de Shroom3 en 3247 pacientes del estudio. La prevalencia alélica de riesgo fue mayor en diabéticos con ERC (51 %) [$*p<0,05$; $**p<0,001$; $***p<0,0001$].

Figura 9: un mapa de constructos de plásmidos indicadores de luciferasa utilizados en el Ejemplo 5 más adelante.

Figura 10A-10B: La Fig.10A es un gráfico que ilustra que los plásmidos indicadores de luciferasa (IL) con elemento potenciador del alelo A mostraron una mayor actividad que los plásmidos del alelo G y los de solo el promotor; La Fig. 10B es una transferencia Western que ilustra que la nucleoproteína extraída de linfocitos T 293 mostró una unión mejorada a las secuencias de oligonucleótidos que contienen el alelo G.

Figuras 11A-11B: La Fig. 11A es un gráfico que ilustra que en PRCEC (células epiteliales corticales renales primarias; del inglés, primary renal cortical epithelial cells), el tratamiento de TGF- β aumenta Shroom3 de una forma dependiente de la dosis (hasta 5ng/ml) y de forma dependiente del tiempo mediante RT-PCR (barras de error: media en PRCEC, el tratamiento de TGF- β aumenta Shroom3 de una forma dependiente del tiempo mediante (hasta 5ng/ml) (barras de error: media $\pm$ ETM) [$*p<0,05$; $**p<0,001$; $***p<0,0001$]. La Fig. 11B es una transferencia Western que ilustra que el tratamiento de TGF- β aumenta Shroom3 de una forma dependiente del tiempo.

Figuras 12A-12B: La Fig. 12A es un gráfico que ilustra los resultados del Ejemplo 6 que muestra que TGF-beta aumenta la expresión de Shroom3 de una manera dependiente de beta-catenina/TCF712. La quercetina (inhibidor de beta-catenina) y BC-21 (inhibidor de TCF712) inhibieron el aumento de la expresión de Shroom3 inducida por TGF-beta (RT-PCR). La Fig. 12B es una transferencia Western que muestra aumentos de proteína Shroom3 de una manera dependiente de Beta-Catenina/TGF- β .

Figuras 13A-13B: La Fig. 13A es un gráfico que ilustra la sobreexpresión de Shroom3 en PRCEC con transfección de PC-SHROOM3 confirmada por RT-PCR y la Fig. 13B mediante transferencia Western, respectivamente (media $\pm$ ETM) [$*p<0,05$; $**p<0,001$; $***p<0,0001$].

Figuras 14A-14C: Fig.14A es un gráfico que ilustra los resultados del Ejemplo 7 y que muestra el efecto sobre la expresión inducida por TGF-beta de marcadores de matriz profibrótica mediante RT-PCR. La sobreexpresión de Shroom3 sola aumentó la producción de colágeno-1 y fibronectina, si bien la atenuación (en inglés, knockdown) suprimió estos marcadores de matriz (media $\pm$ ETM) [$*p<0,05$; $**p<0,001$; $***p<0,0001$]; La Fig. 14B es una transferencia Western que muestra la fosforilación potenciada por sobreexpresión de Shroom3 de Smad-3 en

respuesta a TGF-beta en PREEC a los 15 minutos (derecha); La Fig. 14C es una fotografía que muestra que el tratamiento con TGF-β1 de PREEC con sobreexpresión de SHROOM3 también desarrolló haces de F-actina más prominentes en comparación con las células tratadas con TGFβ1 sin sobreexpresión de SHROOM3 (Fig. 14C, paneles superior e inferior).

Figuras 15A-15B: Gráficos que representan los resultados del Ejemplo 7 que establece que Shroom3 sobreexpresa en PREEC con transfección de PC-SHROOM3, confirmado mediante RT-PCR (Fig.15A) y transferencia Western (Fig.15B), respectivamente (media ± ETM) [$p < 0,05$; $**p < 0,001$; $***p < 0,0001$]

Figuras 16A-16D: (16A) Se ilustran los resultados de genotipado representativos para ROSA-RTTA (transactivador controlado por tetraciclina inversa; del inglés, reverse tetracycline-controlled transactivator) (superior) y COLTGM (inferior). (16B) Se muestran las transferencias Western de fosfo-SMAD3 (p-SMAD3), SMAD3 total (SMAD3), Shroom3 y β-actina de lisados de corteza renal de ratón de riñones UUO de ratones no alimentados con Dox frente a ratones alimentados con Dox (n=2). (16C) De izquierda a derecha: se muestran fotografías que muestran imágenes representativas de baja potencia (10x) del riñón de control y el riñón UUO de animales no alimentados con Dox y los riñones UUO de animales alimentados con Dox. Fila superior: Tinción de Schiff con ácido periódico, fila central: Tinción de rojo Picrosirio. Fila inferior: se realizó el inmunomarcado para COL1A1 (TRITC-Alexa flúor) en secciones de corteza renal congeladas instantáneamente. Se muestran imágenes representativas. El gráfico representa la cuantificación morfométrica del área de tinción COL1A1/área total (%) en 5 campos aleatorios de alta potencia (hpf; del inglés, high power fields) por animal. (16D) Gráficos de barras que ilustran la expresión de ARNm de SHROOM3 y COL1A1 mediante RT-PCR en riñones de control y UUO de animales alimentados con DOX y sin DOX (normalizados a GAPDH; n=5; media ± ETM; ANOVA con comparación de Bonferroni posterior a la prueba; $*p < 0,05$).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término "alrededor de" o "aproximadamente" normalmente significa dentro de un intervalo de error aceptable para el tipo de valor y método de medición. Por ejemplo, puede significar más/menos el 20 %, más preferentemente más/menos el 10 % y, lo aún más preferentemente, más/menos el 5 % de un valor o intervalo dado. Como alternativa, en especial, en los sistemas biológicos, el término "aproximadamente" significa más/menos aproximadamente un logaritmo (es decir, un orden de magnitud) preferentemente más/menos un factor de dos de un valor dado.

La expresión "niveles significativamente más altos de expresión de Shroom3" se define en el presente documento como entre aproximadamente 1,4 y aproximadamente 5 veces mayor que en el control.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los niveles de expresión de SHROOM3 son significativamente mayores en los receptores de aloinjertos de riñón que están en riesgo de desarrollar CAN en comparación con las biopsias de control obtenidas de sujetos normales. En virtud de la presente invención, los niveles de expresión de SHROOM3 se determinan a partir de biopsias obtenidas de receptores de aloinjertos de riñón y se comparan con biopsias obtenidas de controles que son muestras de riñón normales, tales como muestras de biopsia de valor basal de donante vivo o muestras de riñón de cirugías de nefrectomía utilizando técnicas bien conocidas en la materia, tales como inmunotinción, pero preferiblemente mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

En un protocolo de estudio de la genética del rechazo crónico del aloinjerto, se obtuvieron biopsias de todos los pacientes inscritos en diferentes puntos temporales (véanse los ejemplos más adelante). A partir de la micromatriz de ADN realizada sobre biopsias de aloinjerto a los 3 meses, se identificaron y clasificaron genes cuya expresión diferencial se correlacionó con la puntuación CADI y la función renal a los 12 meses. Entre los genes mejor clasificados en esta lista estuvo SHROOM3 (datos no publicados).

Los estudios de asociación del genoma completo han unido fuertemente un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el gen SHROOM3 (rs17319721) con ERC incidente y prevalente mediante TFG en cohortes poblacionales de ascendencia europea {Kottgen A, 2009} {Böger C, 2011}. El gen SHROOM3 codifica una proteína que contiene el dominio PDZ que puede unirse directamente a la F-actina y regular su distribución subcelular en las células. La ausencia completa o defectuosa de SHROOM3 causa defectos del tubo neural abierto y muerte neonatal en ratones (Hildebrand J, 1999). En las líneas celulares de riñón MDCK, SHROOM3 se localiza en los complejos apical y de unión y es crítico para el mantenimiento del fenotipo de células epiteliales normales {Hildebrand J, 2005}. Se sabe también que el dominio C-terminal de SHROOM3 interactúa con las Rho quinasas (ROCK) para facilitar la fosforilación de la miosina y la contracción de la actina {Nishimura T, 2008}.

En el estudio que se notifica en el presente documento, se inscribieron 589 pacientes. Se obtuvieron biopsias de aloinjerto a los 0, 3, 12 y 24 meses después del trasplante con una puntuación del índice de disfunción crónica del aloinjerto (CADI) notificada desde un laboratorio central. El análisis de micromatrices de expresión génica se realizó

sobre biopsias de 3 meses (Affymetrix: 1 chip de Human Exon) y se analizó la correlación con CADI y TFGe de 12 meses (n=160). Se realizaron estudios de sobreexpresión y supresión lentiviral sobre células tubulares primarias humanas (RPTE; del inglés, renal proximal tubule epithelial). Se encontró que la expresión génica de SHROOM3 se correlaciona linealmente con la fibrosis y negativamente con la TFGe en 1 año (n=101; $p<0,05$). Esto se confirmó mediante RT-PCR de forma independiente (n=36). No se observó correlación entre la expresión de SHROOM3 y el CADI de 3 meses (n=137).

Un SNP en SHROOM3 (rs17319721) se ha unido con ERC en estudios de asociación del genoma completo. Como se divulga en el presente documento, se ha encontrado que la presencia de al menos 1 copia del alelo de riesgo (es decir, A/G o A/A) en el ADN de un donante se asocia con una mayor expresión de SHROOM3 intrainjerto a los 3 meses (n=136; $p=0,02$). El alelo de riesgo fue más prevalente en donantes blancos frente a los donantes no blancos. Como se muestra en el Ejemplo 4 más adelante, el alelo de riesgo de SNP es más frecuente en diabéticos blancos con enfermedad renal. Por tanto, se divulga en el presente documento un método para identificar el riesgo de desarrollar CAN en un paciente caucásico diabético que sufre de una enfermedad renal que ha recibido un riñón de un donante, que comprende las etapas de obtener una muestra de sangre del donante en el momento basal y realizar un análisis genético para determinar si el donante es homocigoto para el alelo de riesgo. Como se muestra en el Ejemplo 9 más adelante, el método puede practicarse con pacientes caucásicos no diabéticos. Si el donante es homocigoto para el alelo de riesgo, a continuación, el paciente está en riesgo de ERC o CAN. Este método puede realizarse solo si el donante está disponible, que no siempre es el caso. Si el donante no está disponible a continuación, los niveles de expresión de SHROOM3 pueden examinarse en el paciente. Si bien en los receptores de riñones de donantes blancos la expresión de SHROOM3 fue predictiva de CADI a los 12 meses, esto no fue verdadero para los receptores de donantes vivos o no blancos.

La sobreexpresión de SHROOM3 en RPTE aumentó, al tiempo que la supresión lentiviral disminuyó notablemente la producción de colágeno tipo 1 ($p<0,01$). El exceso de SHROOM3 facilitó, al tiempo que la supresión inhibió la señalización canónica de TGF-beta, evidenciada por fosfo-Smad3 y la producción de marcadores profibróticos. Además, en ratones FVB/N con ERC (nefropatía por VIH y obstrucción ureteral unilateral), la expresión de SHROOM3 aumentó en comparación con los controles según lo determinado mediante RT-PCR. Por tanto, la presente divulgación no se limita a CAN sino que es útil para otras ERC tales como uropatía obstructiva, nefropatía asociada al VIH y nefropatía diabética.

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que Shroom3 está involucrado en cualquier enfermedad que involucre fibrosis, tal como fibrosis hepática y fibrosis pulmonar. Por tanto, los materiales y métodos descritos en el presente documento serán útiles para controlar la progresión de tales enfermedades. Como se muestra más adelante en el Ejemplo 10, la fibrosis intersticial renal se anuló significativamente en animales de Shroom3 atenuado en un modelo de ratón. Estos resultados validan el papel de SHROOM3 en estas enfermedades.

Se describen adicionalmente kits para utilizar en los métodos divulgados en el presente documento. Los kits comprenden, en recipientes separados, los siguientes componentes: cebadores para ensayos de expresión de SHROOM3 de RT-PCR, una micromatriz para análisis de expresión génica y cebadores para análisis de RT-PCR del alelo de riesgo de rs 17319721, tampones e instrucciones de uso. En la Tabla 5 se expone una lista no limitante de cebadores para usar en los kits. El control positivo comprende las células que sobreexpresan SHROOM3 o tejidos cerebrales, tales como neuroepitelio, que se sabe que tienen altos niveles de expresión de SHROOM3. (Shroom3-mediated recruitment of Rho kinases to the apical cell junctions regulates epithelial and neuroepithelial planar remodeling - Tamako Nishimura and Masatoshi Takeichi, Development 135, 1493-1502 (2008) doi:10.1242/dev.019646).

En el presente documento se divulgan métodos para identificar receptores de aloinjertos de riñón que están en riesgo de desarrollar enfermedades renales tales como CAN o ERC. Cuando se identifican dichos pacientes, la presente divulgación incluye métodos para tratar dichos pacientes. Tales métodos incluyen, sin limitación, la administración de fármacos inmunosupresores, es decir, un inhibidor de la calcineurina (CNI; del inglés, calcineurin inhibitor), tal como ciclosporina o tacrolimus o como mínimo fármacos inmunosupresores fibrogénicos tales como micofenolato mofetilo (MMF) o sirolimus. Dado que los pacientes que están identificados como en riesgo de desarrollar CAN o ERC tienen la función renal afectada y a menudo sufren de hipertensión, la administración de un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (IECA; en inglés, ACEI) tal como lisinopril o un bloqueo del receptor de angiotensina II, tal como losartán, a tales pacientes se divulga en el presente documento.

Adicionalmente se divulgan métodos que utilizan SHROOM3 como una diana para la detección de fármacos útiles para el tratamiento de CAN y ERC. Las células 293T transfectadas con el constructo de alelo A de SHROOM3/luciferasa, descrito en el Ejemplo 5 más adelante, se pueden utilizar en ensayos de detección para identificar fármacos para el tratamiento de enfermedades fibróticas mediadas por SHROOM3. Las células pueden sembrarse en microplacas de 96 pocillos, ponerse en contacto con fármacos candidatos y analizarse para detectar cambios en la actividad de luciferasa. La actividad de SHROOM3 (es decir, luciferasa) se medirá en el momento basal y los inhibidores Quercetina y/o BC-21, pueden utilizarse como controles positivos.

Como alternativa, las células 293T se tratarán con TGFB1 (5-10 ng/ml), un regulador positivo conocido de la

expresión de SHROOM3 y estas células (con un valor basal de expresión de SHROOM3 más alto) se usarán en los ensayos de detección. Estos ensayos se pueden desarrollar en un formato de alto rendimiento.

Los cebadores para utilizar en ensayos de RT-PCR para el alelo A y para generar los constructos indicadores de luciferasa se exponen en la Tabla 5.

Resumiendo, SHROOM3 se ha identificado como un nuevo gen candidato cuya expresión en un aloinjerto renal precede y predice el desarreglo de la función renal y de FTI en CAN. Pueden utilizarse niveles significativamente más altos de SHROOM3 de aloinjerto para predecir la progresión histológica de CAN. Además, se ha descubierto que estas relaciones son más predictivas en los receptores de riñones de donantes blancos. Estos hallazgos confirman por primera vez que el locus de SHROOM3 (rs17319721) asociado a ERC descrito anteriormente [Kottgen A, 2009] [Böger C, 2011] media su efecto a través de la expresión de SHROOM3 aumentada. Por último, los estudios *in vitro* descritos en el presente documento sugieren un papel beneficioso para SHROOM3 en la señalización canónica de TGF-beta y la producción de colágeno-1 en las células tubulares renales. En conjunto, estos hallazgos demuestran que SHROOM3 es una diana terapéutica tanto en CAN como en ERC y la supresión de su nivel puede utilizarse para inhibir la progresión de FTI y retardar ERET.

La presente invención se describe más adelante en los ejemplos de trabajo que tienen por objeto describir adicionalmente la invención sin limitar el alcance de la misma.

En los Ejemplos más adelante, se usaron los siguientes materiales y métodos.

Biopsias y extracción de ARN: Se obtuvieron biopsias en tiempo real guiadas por ultrasonido de aloinjerto renal a los 0, 3, 12 y 24 meses después del trasplante, en 3 de 5 centros clínicos. Se extrajeron dos núcleos utilizando agujas de biopsia con resorte de 18G cuando fue posible. Si se obtuvo un solo núcleo, se dio preferencia a la extracción de ARN (kit QIAGEN-ALLprep, Valencia, California, EE.UU.) en la visita a los 3 meses y al análisis histológico a los 12 meses. El tejido para los estudios de expresión génica se almacenó inmediatamente en RNAlater y se envió a -20 °C a una instalación central de genómica.

Transcripción inversa: El ARN extraído de la biopsia se transcribió de manera inversa usando RT de una etapa Sensiscript (Qiagen) y cebador Oligo DT (Qiagen) con una cantidad inicial de ARN total de 55 ng. No se utilizaron muestras de extracción con concentraciones de ARN < 5 ng/ml por nanogota. Para los estudios *in vitro* los presentes investigadores utilizaron Superscript-III (tecnologías de Invitrogen-Life, Grand Island, Nueva York) con ARN total inicial de 500-1000 ng.

RT-PCR: Se diseñaron conjuntos de cebadores que abarcan intrones para *Shroom3* utilizando Primer-BLAST (NCBI) y los amplicones de PCR se confirmaron tanto por análisis de la curva de fusión como por electroforesis en gel de agarosa. La expresión de *Shroom3* se analizó en una cohorte interna y externa de pacientes mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) (ciclador 7500 de Applied biosystems).

Análisis de SNP de Shroom3: El genotipado dirigido se realizó para el SNP de Shroom3 (rs17319721) utilizando el ensayo de análisis de SNP de Taqman (N.º de cat.: 4351379 Applied Biosystems, Foster City, California). Se extrajo ADN (kit de QIAGEN-ALLprep, Valencia, California, EE.UU.) a partir de biopsias previas a la implantación o de sangre para el SNP del donante y de sangre periférica para el ensayo del SNP del receptor. Se realizó un análisis automatizado utilizando el software Genotyping de Applied Biosystems (ciclador 7500 de Applied Biosystems).

Constructos de promotor-potenciador de Shroom3 y ensayo de indicador de luciferasa: Los fragmentos promotores que abarcan -3000 bases en 5' del sitio de inicio de la traducción de SHROOM3 se amplificaron por PCR utilizando conjuntos de cebadores que opcionalmente incluyeron secuencias de veinticuatro pares de bases del intrón-1 de SHROOM3, incluyendo el sitio rs17319721 que contiene cualquiera de los dos alelos (A o 1. G) (Tabla 1). Se introdujeron sitios de restricción para KpnI en todos los cebadores directos y Hind III en los inversos. A continuación, los productos de la PCR se clonaron en el vector indicador de luciferasa pGL3 Básico (E-1751, Promega, Wisconsin, EE.UU.) utilizando sitios Kpn I y Hind III. Esto generó 3 plásmidos indicadores: solo promotor, promotor con secuencias intrónicas -A o -G.

La transfección transitoria de estos constructos (1mcg cada uno) con el plásmido indicador de luciferasa de Renilla pTL-TK (200 ng) se llevó a cabo en células HEK293T sembradas en placas de 6 pocillos al 80 % de confluencia (reactivo Polyjet, laboratorios Signa-Gen, Rockville, Maryland). Después de 24 horas, las células se lisaron y se extrajeron las proteínas. La actividad de renilla y luciferasa se midió en lisados utilizando un sistema de ensayo de luciferasa dual (PJK Alemania) en un lector de microplacas de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se expresaron los resultados y la relación Luciferasa: Renilla.

Transferencia Western: Las células se lisaron con un tampón que contiene Triton al 1 %, una mezcla de inhibidores de proteasa e inhibidores de fosforilación de tirosina y serina/treonina y de fosfatasa. Los lisados se sometieron a análisis de inmunotransferencia utilizando anti-Shroom3 de conejo (un obsequio del Dr. Jeffrey Hildebrand, Pittsburgh), anticuerpo de anti-etiqueta V5 (R960-25, tecnologías de Invitrogen-Life), anticuerpo de fosfo-Smad3

(policlonal de conejo -pS423/425) y Smad-3 (monoclonal de conejo Smad-3, n.º 9523, de Epitomics, Burlingame, California). La densitometría se realizó como se describió anteriormente {Gassman 2009}.

Estudios de sobreexpresión: Se clonó un constructo de Shroom3 humano (Open Biosystems, Lafayette, Colorado) en un vector de expresión de mamíferos PC-DEST40 (Invitrogen, Carlsbad, California) con etiquetas V5 e histidina C-terminales utilizando la recombinasa Clonase-II (Invitrogen). La transfección por electroporación utilizando la tecnología Lonza Nucleofector (kit básico Nucleofector para células epiteliales primarias de mamíferos, Programa T20) se utilizó para transfectar células epiteliales corticales renales primarias (PRCEC) como se describió anteriormente {Jin Y, 2012}. La expresión forzada se confirmó en PRCEC mediante RT-PCR y transferencia Western con la transfección del vector de destino vacío como control. Los marcadores de la matriz extracelular profibrótica se analizaron en PRCEC mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). El efecto del tratamiento con TGF- β sobre la producción de marcadores de matriz en células transfectadas con Shroom3 se ensayó en un medio sin nutrientes 36 horas después de la transfección. Se midió la fosforilación de Smad-3 a los 5, 15 y 30 minutos de tratamiento con TGF-Beta.

Estudios de supresión de ARNip de Shroom3: Se analizaron clones de horquillas cortas de Shroom3 humano (Open Biosystems, Lafayette, Colorado) para la supresión de Shroom3 mediante RT-PCR y transferencia Western en células 293-T. La horquilla marcada con GFP seleccionada se transfectó en células 293-T junto con plásmidos de envuelta (reactivo Polyjet) para generar un constructo de expresión lentiviral pseudotipado VSV de mamífero. Se infectaron PRCEC utilizando este constructo lentiviral y se confirmó la supresión de Shroom3. Para la supresión de Shroom3 *in vivo* en ratón, se preseleccionaron secuencias de horquilla supresoras potentes utilizando un ensayo de sensor Ping-Pong capaz de descifrar bibliotecas de ARNhc elaboradas (Mirus Inc, Long Island, Nueva York). Se transdujeron podocitos de ratón con estas secuencias en un esqueleto lentiviral Mir30 y se analizaron en cuanto a la supresión de Shroom3 utilizando RT-PCR y transferencia Western. Se seleccionaron dos secuencias para la inyección de células madre embrionarias en ratones para desarrollar un modelo de ratón de ARNhc de Shroom3 inducible por tetraciclina.

Características de los participantes

Quinientos ochenta y nueve beneficiarios se inscribieron en el estudio desde 5 centros al finalizar la inscripción para el estudio. Las características demográficas y clínicas de los donantes y receptores de la cohorte se enumeran en la Tabla 1. Las características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en los estudios de micromatrices se detallan en la Tabla 2.

EJEMPLO 1: SHROOM3 está regulado positivamente y asociado con la progresión de CAN

Para identificar genes que podrían contribuir potencialmente al desarrollo de CAN, los presentes inventores realizaron un análisis provisional para los primeros 66 sujetos de la cohorte que tenían los datos de micromatrices de expresión génica de la biopsia del aloinjerto de 3 meses, así como TFGe_12 y CADI_12. Se identificó y clasificó una lista de genes candidatos implicados en la progresión de CAN, es decir, genes cuya expresión en la muestra de aloinjerto de 3 meses se correlacionaba con un TFGe_12 bajo así como con un CADI_12 alto. SHROOM3 se encontraba entre los genes mejor clasificados de la lista (Tabla 3). Desde el análisis provisional, los presentes inventores recopilaron y analizaron muestras adicionales. En el momento de la preparación de la presente solicitud, se habían realizado perfiles de expresión génica de aloinjerto de 3 meses en 160 aloinjertos y de los que TFGe de 12 meses (TFGe_12) estaba disponible en 147 sujetos y CADI de 12 meses (CADI_12) estaba disponible en 101 sujetos (Fig. 1). Cuando los presentes inventores volvieron a examinar la correlación de la expresión de SHROOM3 del aloinjerto de 3 meses en los 147 sujetos que tenían TFGe_12 disponible, la expresión de SHROOM3 del aloinjerto de 3 meses se correlacionó inversamente con TFGe_12 ($r=-0,2192$, $p<0,01$, Fig. 2A). De los 101 sujetos que tenían CADI_12, la expresión de SHROOM3 del aloinjerto de 3 meses en el análisis de micromatrices de expresión génica se correlacionó linealmente con CADI_12 ($p=0,03$, Fig. 2B), que siguió siendo significativa ($p=0,02$) cuando 2 de las muestras de aloinjerto fueron excluidas del análisis (uno con nefropatía por virus BK y otro con cicatrización cortical). Sin embargo, no se observó correlación entre la expresión de SHROOM3 del aloinjerto de 3 meses y el CADI simultáneo de 3 meses ($n=135$; $r=-0,1273$, $p=0,14$, Fig. 3D). Las relaciones de la expresión de SHROOM3 de 3 meses respecto a CADI_12 y TFGe_12 se validaron adicionalmente mediante análisis cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) en una cohorte interna de 32 sujetos ($r=-0,3873$, $p=0,02$ para TFGe_12 y $r=0,3774$, $p=0,03$ para CADI_12, Figs. 3C y 3D). Los presentes inventores también encontraron una fuerte correlación entre la expresión de SHROOM3 de micromatrices y de qRT-PCR ($n=32$, $r=0,5613$; $p=0,0008$, (Figs. 2B y 2C). La relación entre el log de la expresión de SHROOM3 y CADI de 12m fue más fuerte en RDF (receptores de donantes fallecidos; en inglés, DDRs) ($p<0,01$) (Fig. 2D). En un análisis multivariante, solo el tiempo de isquemia fría y la presencia de rechazo agudo tuvieron un efecto significativo sobre CADI_12. La expresión de SHROOM3 permaneció significativa en donantes fallecidos ($p=0,02$). De los 160 sujetos que tenían expresión de SHROOM3 de aloinjerto de 3 meses examinada mediante micromatrices, 85 tenían puntuaciones CADI de 3 y 12 meses disponibles. Para corroborar adicionalmente que la expresión de SHROOM3 se asocia con la progresión de CAN, los presentes inventores compararon la expresión de SHROOM3 entre aloinjertos que tenían ≥ 2 aumentos en la puntuación CADI ($n=17$; progresores) con los de menos de <2 incrementos ($n=68$; no progresores) entre biopsias de 3 a 12 meses. La expresión de SHROOM3 fue significativamente mayor en los progresores en

comparación con los no progresores ($p=0,04$).

EJEMPLO 2: Existe una asociación de la progresión de SHROOM3 y CAN en aloinjertos de donantes caucásicos

- 5 Dado que una variante genética de SHROOM3 (variante rs17319721 de SNP) se asocia con ERC cuando se estudia en cohortes predominantemente caucásicas [Kottgen A, 2009], los presentes inventores buscaron determinar si la relación observada entre SHROOM3 y CAN seguía una predilección racial. De los 147 aloinjertos con TFGe_12 disponible, 109 eran de donantes caucásicos y su expresión de SHROOM3 estuvo inversamente correlacionada con TFGe_12 ($r=-0,2712$, $p<0,01$, Fig. 4A). Entre los 101 aloinjertos con CADI_12 disponible, 80 eran de donantes caucásicos y la expresión de SHROOM3 en esos aloinjertos estuvo correlacionada significativamente con CADI_12 ($p=0,02$, Fig. 4B). En aloinjertos de no caucásicos, la expresión de SHROOM3 no estuvo significativamente correlacionada con TFGe_12 ($n=38$) o CADI_12 ($n=21$) (Fig. 5B, 5C). Entre los 85 pacientes con CADI_3 y CADI_12, 70 recibieron riñones de donantes caucásicos. En ellos, los presentes investigadores compararon la expresión de Shroom3 entre progresores y no progresores. La expresión de SHROOM3 para los 14 aloinjertos que desarrollaron ≥ 2 incrementos en CADI fue significativamente mayor en aquellos con <2 cambios en CADI ($n=56$) (Fig. 3C). La expresión de SHROOM3 en la biopsia de aloinjerto de 3 meses también fue significativamente diferente entre aloinjertos con diferente gravedad de CAN basándose en CADI_12: baja (CADI 0-1; $n=49$), intermedia (CADI 2-5; $n=24$), alta (CADI > 5 ; $n=7$) ($p=0,03$, Fig. 3C).

- 20 EJEMPLO 3: Una variante de SHROOM3 no codificante en el donante se asocia con la expresión de SHROOM3 aumentada

El alelo A (alelo menor) de un SNP de SHROOM3 no codificante en rs 17319721 se ha vinculado fuertemente con la enfermedad renal crónica mediante creatinina de TFGe [Kottgen A, 2009; Böger C, 2011]. Los presentes inventores realizaron un genotipado de SNP dirigido para la variante rs17319721 en 540 receptores de aloinjertos y 468 muestras de donantes. La prevalencia alélica del alelo de riesgo (A) fue de un 36,66 % entre los receptores y de un 40,02 % entre los donantes. Tanto en receptores como en donantes, los presentes inventores observaron que la prevalencia del alelo de riesgo fue significativamente mayor en los caucásicos en comparación con los no caucásicos ($p<0,0001$) (Fig. 6A). Dado que una mayor expresión de SHROOM3 se correlaciona con la progresión de CAN y que el alelo de riesgo de SHROOM3 se asocia con ERC en cohortes predominantemente caucásicas, en el presente documento se examinó si la expresión de SHROOM3 del aloinjerto se correlacionaba con la presencia del alelo de riesgo. De los 160 aloinjertos para los que estaba disponible la expresión de SHROOM3, se realizó el genotipado de SNP dirigido de la variante rs17319721 en 136 casos en los que se disponía de muestras de sangre del donante o muestras de biopsia de aloinjerto antes de la perfusión. La expresión de SHROOM3 fue significativamente mayor en aloinjertos que eran homocigotos para el alelo de riesgo (A/A, $n=14$) en comparación con aloinjertos que eran homocigotos para el alelo G (G/G, $n=52$, $p=0,01$, Fig. 6B). La expresión de SHROOM3 de aloinjertos A/G ($n=70$) no fue significativamente diferente de A/A o G/G. Sin embargo, la expresión de SHROOM3 fue significativamente mayor en los aloinjertos de donantes con al menos un alelo de riesgo (A/A o A/G; $n=84$) en comparación con los donantes sin el alelo de riesgo (G/G; $n=52$, $p=0,02$). Cuando se examinó específicamente en 103 aloinjertos de donantes caucásicos y 33 aloinjertos de donantes no caucásicos, la relación entre la expresión de SHROOM3 y el alelo de riesgo en el aloinjerto permaneció constante pero no alcanzó significación estadística ($p=0,05$ en donantes caucásicos, Fig. 7A y 7B respectivamente). Curiosamente, cuando los presentes inventores examinaron la relación de la expresión de SHROOM3 con el genotipo del receptor en lugar de con los donantes, no hubo una correlación significativa entre el alelo de riesgo y la expresión en 147 receptores (Fig. 7C).

- 45 EJEMPLO 4: El alelo de riesgo de SHROOM3 está asociado con la diabetes mellitus como causa de ERET y ERC en caucásicos

Dado que la variante de riesgo de SHROOM3 se ha unido a ERC, los presentes inventores examinaron si el alelo de riesgo está asociado con ERET de etiología particular en nuestra cohorte de receptores. Como el alelo de riesgo de SHROOM3 se distribuyó de manera diferente entre las diferentes etnias (Tablas 4a y 4b), los presentes inventores han restringido todas las comparaciones posteriores entre donantes y receptores a la misma etnia. Observamos que la frecuencia alélica del alelo de riesgo no fue significativamente diferente entre donantes y receptores caucásicos (un 42,87 % frente a un 43,07 % respectivamente). Como solo 114 de los 468 donantes no eran caucásicos, el número de sujetos en cada etnia no caucásica (es decir, AA, asiáticos, hispanos y otros) fue insuficiente para hacer una inferencia válida sobre el genotipo de SHROOM3 y su relación con la etiología de la ERET. Cuando los presentes inventores analizaron la prevalencia alélica entre los receptores caucásicos de acuerdo con su diagnóstico documentado de ERET (excluyendo los receptores que habían tenido trasplantes previos, enfermedades congénitas o etiología desconocida de ERET), observaron que el alelo de riesgo era más prevalente en los receptores caucásicos con diabetes mellitus como diagnóstico primario de ERET (47,25 %; $n=126$). Encontramos que los receptores caucásicos con diabetes sola sin hipertensión (HTA) tenían una razón de probabilidades no ajustada de 1,418 (IC del 95 % = 1,000-2,11; $p=0,04$), si bien los pacientes con diabetes con hipertensión tenían una razón de probabilidades de 1,36 (IC del 95 % = 1,031-1,814; $p=0,029$) de tener el alelo de riesgo cuando ambos se compararon con todos los donantes caucásicos que no estaban relacionados con los receptores (Fig. 8A). Además, la prevalencia alélica del alelo de riesgo en pacientes con diagnóstico distinto de diabetes y HTA como causas de ERET fue de un 38,36 % ($n=159$), que no fue significativamente diferente de la frecuencia alélica en donantes de

aloinjerto no emparentados (39,64 %). Para la validación externa de la asociación del alelo de riesgo con la enfermedad renal diabética, los presentes inventores analizaron una cohorte independiente de sujetos. Entre los participantes caucásicos del estudio (n=3782), se identificó que 763 tenían ERC. De nuevo, la prevalencia alélica fue significativamente mayor en aquellos con diabetes y ERC (n=138) en comparación con aquellos sin ERC (n=3019) y aquellos sin ERC o diabetes (n=2691) (un 50,4 % frente a un 40,4 % frente a un 39,3 %, $p<0,01$) (Fig. 8B). En el análisis multivariante dentro de la cohorte caucásica utilizando la edad, IMC (en inglés, BMI), hipertensión, diabetes, antecedentes familiares de diabetes o enfermedad renal como covariables, el ajuste por diabetes anuló cualquier efecto del alelo de riesgo sobre ERC como resultado. La prevalencia alélica también fue similar en los no diabéticos con y sin ERC (un 38,6 % frente a un 39,26 % respectivamente). Dentro de la cohorte de ERC, los AA con ERC (n=721) y diabetes con ERC (n=204) tuvieron una distribución alélica similar a aquellos sin ERC (n=2729) (un 20,59 % frente a un 18,46 % frente a un 21,78 %; $p=0,8159$) lo que sugiere que el SNP de SHROOM3 no juega un papel significativo en la enfermedad renal diabética/no diabética en este grupo.

EJEMPLO 5: El alelo de riesgo de rs17319721 potencia la expresión de SHROOM3 a través de la activación transcripcional mediada por TCF4. rs17319721 se localiza dentro del primer intrón de SHROOM3. Dado que el alelo A se asocia con una mayor expresión de SHROOM3, los presentes inventores buscaron comprender el efecto de la sustitución de G por A en la regulación transcripcional de SHROOM3. Cuando los presentes inventores examinaron la región intrónica de SHROOM3 que contiene rs17319721, se encontró que la sustitución de G por A genera una secuencia de unión de consenso potencial para el factor de transcripción 4 (TCF4/TCF7L2), una transcripción que contiene una caja de grupo de alta movilidad (HMG; del inglés, high mobility group) con la secuencia consenso de unión de 5'-(A/T)(A/T)CAAAG-3'. TCF4 está implicado en la ruta de señalización de Wnt/ β -catenina [Wortman B, 2002; Henderson LJ, 2012]. Adicionalmente en el análisis de micromatrices del presente documento, los pacientes en el cuartil más alto de expresión de Shroom3 tuvieron también TCF7L2 y Beta-Catenina significativamente regulados positivamente ($p<0,0001$). Para examinar adicionalmente si esta región intrónica que contiene el SNP de rs17319721 posee alguna función como potenciadora de la transcripción de SHROOM3, los presentes inventores generaron dos constructos de indicador de luciferasa promotor-potenciador de SHROOM3 que consistieron en una región promotora de SHROOM3 de 3Kb y una secuencia de 100pb del primer intrón de SHROOM3 que contiene el alelo A o el alelo G del rs17319721 (Fig. 9. mapas de constructos). El constructo indicador de SHROOM3 con el alelo A tuvo un aumento mayor en la actividad indicadora de luciferasa a renilla en comparación con el alelo G sin estimulación de TGF β y con estimulación de TGF β hubo un aumento en la actividad. El tratamiento con un inhibidor de TCF4, BC21 o un inhibidor de β -catenina Quercetina, anuló la diferencia en la actividad indicadora entre los constructos indicadores de los alelos A y G (Fig. 10A), lo que confirmó adicionalmente que la secuencia potenciadora de TCF4 es responsable de la diferencia en la expresión de los constructos indicadores del alelo A frente al G. Para confirmar adicionalmente la unión de TCF4 a la región intrónica de SHROOM3 de 100 pb, los presentes inventores realizaron EMSA. La unión de TCF4 a la secuencia intrónica que contiene el alelo A fue mayor que la del alelo G, que se anuló en muestras con exceso de oligos fríos (Fig. 10B)

EJEMPLO 6: TGF β 1 mejora la expresión de SHROOM3 de una manera dependiente de β -catenina/TCF4

Dado que SHROOM3 está regulado por TGF β 1 en células HK-2 [Brennan EP, 2012] y que TGF β 1 es un factor de crecimiento clave que media la lesión renal y la fibrosis [1an HY 2012], los presentes inventores caracterizaron adicionalmente la regulación de SHROOM3 mediada por TGF β 1. Los presentes inventores encontraron que el tratamiento con TGF β 1 de PRCEC aumentó la expresión de ARNm de SHROOM3 de forma máxima a 5 ng/ml (Fig. 11A) y la expresión de proteínas a las 48 horas (Fig. 11B). El análisis de la secuencia del promotor SHROOM3 (hasta - 10kb desde el sitio de inicio de la transcripción) utilizando un programa de predicción del motivo de unión al factor de transcripción (TRANSFAC) no reveló ninguna secuencia de unión a Smad, lo que sugiere que el aumento inducido por TGF β 1 en la expresión de SHROOM3 no se debe a la señalización canónica de TGF β 1/SMAD. Como se sabe que TGF β 1 interfiere con la ruta de Wnt/ β -catenina/TCF4 y que TCF4 regula la expresión de SHROOM3, los presentes inventores analizaron si la expresión de SHROOM3 inducida por TGF β 1 depende de la interacción β -catenina/TCF4. Encontramos que tanto BC-21 como quercetina anularon el aumento inducido por TGF β 1 en la expresión de la proteína SHROOM3 (Fig. 12A) y ARNm (Fig. 12B), confirmando por tanto que la expresión de SHROOM3 inducida por TGF β 1 es dependiente de β -catenina/TCF-4.

EJEMPLO 7: SHROOM3 facilita la señalización canónica de TGF β 1/SMAD3 y la expresión génica profibrótica

Los presentes inventores investigaron si SHROOM3 tiene algún impacto en el programa génico profibrótico mediado por TGF β 1, que es un impulsor bien caracterizado de la fibrosis renal en la ERC, así como en la CAN [Lan HY 2012; Campistol JM 2001]. Los presentes inventores primero compararon la expresión de genes diana de TGF β 1 relacionados con la fibrosis tisular en PRCEC con o sin sobreexpresión de SHROOM3 que fueron tratados con TGF β 1 o con vehículo. La sobreexpresión de SHROOM3 se confirmó mediante RT-PCR (Fig. 13A) y transferencia Western (Fig. 13B). La expresión de genes diana de TGF β 1 profibróticos, incluyendo COL1A1 y FN1, se incrementó mediante el tratamiento con TGF β 1 solo, así como con la sobreexpresión de SHROOM3 solo (Fig. 14A). La expresión de COL1A1 inducida por TGF β 1 se incrementó adicionalmente en las células con sobreexpresión de SHROOM3 en comparación con aquellas sin sobreexpresión de SHROOM3 (Vector+TGF). Para caracterizar adicionalmente cómo SHROOM3 facilitó la señalización de TGF β 1, los presentes inventores investigaron la fosforilación de SMAD-3 que indica la activación de la señalización canónica de TGF β 1/SMAD en PRCEC. Las

células con o sin sobreexpresión de SHROOM3 se trataron con TGFβ1 o con vehículo. La fosforilación de Smad3 en células tratadas con TGFβ1 estuvo potenciada por la sobreexpresión de SHROOM3 en comparación con las células transfectadas con vector (Fig. 14B). El tratamiento con TGFβ1 de PCEC con sobreexpresión de SHROOM3 también desarrolló haces de F-actina más prominentes en comparación con las células tratadas con TGFβ1 sin sobreexpresión de SHROOM3 (Fig. 14C, paneles superior e inferior). A continuación, los presentes inventores buscaron determinar si el programa de genes profibróticos inducido por TGFβ1 depende de SHROOM3. La atenuación de SHROOM3 en PCEC redujo significativamente los transcritos COL1A1 y FN1 (Fig. 15A). La expresión de COL1A1 inducida por TGFβ1 también se atenuó significativamente en las células de SHROOM3 atenuado en comparación con las células transducidas con el lentivector vacío. Sin embargo, la expresión de FN1 inducida por TGFβ1 no estuvo afectada por la atenuación de SHROOM3. La fosforilación de SMAD3 en células con atenuación de SHROOM3 se redujo significativamente a los 30 min, pero no a los 15 min, después de la estimulación con TGFβ1 en comparación con las células sin atenuación de SHROOM3 (Fig. 15B). Cuando se toman en conjunto, estos resultados sugieren que SHROOM3 facilita el programa de expresión génica profibrótica inducida por TGFβ1/SMAD3. Un apoyo adicional de esto fue el hallazgo de los presentes inventores en la cohorte de micromatrices de CTGF, vimentina, colágeno-IV (aguas abajo de la señalización de TGF/SMAD3) se encontraban entre los genes significativamente regulados positivamente en pacientes en el cuartil más alto de expresión de SHROOM3.

EJEMPLO 8: El alelo A de rs17319721 en el donante se asocia con una mayor expresión de SHROOM3 del aloinjerto a los 3 meses.

En la actualidad, múltiples estudios han vinculado el SNP de rs 17319721 de SHROOM3 con CKD20-22. Se desconoce si el alelo de riesgo está asociado con la expresión alterada de SHROOM3 en el parénquima renal o si se relaciona con CAN. Al 1 de enero de 2013, quinientos ochenta y nueve beneficiarios se inscribieron en el estudio parental. Los presentes inventores realizaron un genotipado dirigido para este locus en 540 receptores de aloinjertos y 517 donantes dentro de la cohorte del presente estudio. La prevalencia alélica del alelo A asociado a ERC fue de un 36,66 % entre los receptores y de un 39,94 % entre los donantes. En conjunto, la prevalencia del alelo A fue similar para los donantes y receptores caucásicos (un 42,87 % frente a un 42,56 % respectivamente). El número de sujetos en cada etnia no caucásica (es decir, AA, asiáticos, hispanos y otros) no fue suficiente para hacer una inferencia válida sobre la distribución de rs 17319721. Tanto en receptores como en donantes, los presentes inventores observaron que la prevalencia del alelo A es significativamente mayor en los caucásicos en comparación con los no caucásicos ($p < 0,0001$).

A continuación, los presentes inventores examinaron si la expresión de SHROOM3 del aloinjerto a los 3 meses (SHROOM3-3M) se correlacionaba con la presencia del alelo A. El análisis de micromatrices de expresión génica de aloinjerto a partir de biopsias de protocolo de 3 meses se realizó en 159 de los 589 participantes en este estudio. Estos pacientes representan por cronología los primeros 159 inscritos a los que se les realizó una biopsia 3 meses después del trasplante. Ambos resultados del genotipado dirigido para los niveles de transcritos de rs 17319721 y SHROOM3 de aloinjertos de riñón estaban disponibles de 136 donantes y 145 receptores. Los presentes inventores observaron que la SHROOM3-3M fue significativamente mayor en aloinjertos que eran homocigotos para el alelo de riesgo (A/A, $n=14$) en comparación con aloinjertos que eran homocigotos para el alelo G (G/G, $n=52$, $p=0,01$). SHROOM3-3M fue también significativamente mayor en los aloinjertos de donantes con al menos un alelo de riesgo (A/A o A/G; $n=84$) en comparación con los donantes sin el alelo de riesgo (G/G; $n=52$, $p=0,02$). Curiosamente, cuando los presentes inventores examinaron la relación de SHROOM3-3M con respecto al genotipo del receptor, en lugar del del donante, no hubo una correlación significativa entre el alelo A y SHROOM3-3M ($n=145$).

EJEMPLO 9: La expresión de SHROOM3 de aloinjertos a los 3 meses y el alelo A de rs17319721 estuvo asociada con un mayor riesgo de CAN en receptores de aloinjertos renales.

Dado que los presentes inventores observaron que el alelo A de rs17319721 está asociado con la activación transcripcional de SHROOM3 y que la expresión de SHROOM3 aumentada facilitó la señalización de TGF-β1 en PCEC, examinamos si SHROOM3-3M y/o el genotipo de riesgo del donante se correlacionaba(n) con índices de disfunción del aloinjerto (CAN) a los 12 meses.

El análisis de micromatrices de expresión génica de aloinjerto a partir de biopsias de protocolo de 3 meses se realizó en 159 de los 589 participantes en este estudio. En el momento de esta presentación, TFGe-12 estaba disponible en 147 sujetos y CADI-12 estaba disponible en 101 sujetos del subgrupo. Las razones para no tener una biopsia a los 12 meses en este subgrupo incluyeron la pérdida del injerto ($n=8$), fallecimiento ($n=1$), pérdida del seguimiento ($n=9$), contraindicación o incapacidad de obtener una biopsia de aloinjerto renal ($n=40$).

SHROOM3-3M se correlacionó inversamente con TFGe-12 ($r=-0,2192$, $p<0,01$) y positivamente con CADI-12 ($r=0,2458$, $p=0,03$). Esta correlación permaneció significativa ($p=0,01$) después de la exclusión de 2 biopsias con diagnóstico (nefropatía por virus BK y cicatrización cortical grave). La relación entre SHROOM3-3M y CADI-12 fue más fuerte en aloinjertos de donantes fallecidos ($p<0,01$). Las relaciones de SHROOM3-3M con CADI-12 y TFGe-12 fueron validadas adicionalmente por qRT-PCR en una cohorte interna de 32 sujetos ($r=-0,39$, $p=0,02$ para TFGe-12 y $r=0,38$, $p=0,03$ para CADI-12). Existió una correlación robusta entre las expresiones de SHROOM3 de micromatrices

y qRT-PCR ($p=0,0008$). No existió correlación, sin embargo, entre SHROOM3-3M y CADI de 3 meses simultáneo ($n=135$). SHROOM3-3M fue predictivo de CADI-12 mayor que 2 ($CADI-12 \geq 2$) y estuvo inversamente relacionado con TFGe-12 en el análisis multivariante. Entre las covariables incluidas en el análisis, el rechazo agudo antes de los 3 meses tuvo efectos independientes significativos sobre CADI-12 y sobre TFGe-12 ($p<0,05$).

Para corroborar que SHROOM3-3M está asociado con la progresión de CAN, los presentes inventores compararon SHROOM3-3M entre aloinjertos que tuvieron un aumento ≥ 2 en la puntuación de CADI ($\Delta CADI \geq 2$, $n=17$, conocidos como progresores) con aquellos con menos de < 2 cambios en la puntuación de CADI ($\Delta CADI < 2$, $n=68$, conocidos como no progresores) entre las biopsias de 3 y 12 meses. Para minimizar el efecto de la enfermedad basal sobre la progresión histológica posterior, los presentes inventores excluyeron los aloinjertos con $CADI-3 > 2$ de este análisis. SHROOM3-3M fue significativamente mayor en los progresores en comparación con los no progresores ($p=0,04$).

A continuación, los presentes inventores examinaron el genotipo de riesgo del donante y su asociación con CAN. En el momento del análisis, doscientos tres sujetos de la cohorte habían tenido puntuaciones CADI notificadas a los 12 meses (101 de la cohorte de micromatrices y 102 de la cohorte sin micromatrices). En este grupo, la presencia del alelo A en el donante se asoció con un riesgo significativamente mayor de un $CADI-12 \geq 2$ en todos los aloinjertos ($OR=1,98$, $IC=1,10-3,59$), indicando un mayor riesgo de CAN con el alelo de riesgo.

EJEMPLO 10: SHROOM3 facilita la señalización canónica de TGF- β 1/SMAD3 y la expresión génica profibrótica en un modelo murino *in vivo*:

MÉTODOS

Para examinar el mecanismo de facilitación de la fibrosis por SHROOM3, los presentes inventores desarrollaron un modelo murino de SHROOM3 atenuado mediado por ARNhc. En nuestro modelo, los elementos transactivadores controlados por tetraciclina inversa (RTTA) se unieron al promotor universal ROSAm26 para la expresión de RTTA en todos los tipos de células. Después de la validación *in vitro*, dos horquillas de ARNhc específicas de SHROOM3 se unieron a elementos sensibles a la doxiciclina-RTTA y se colocaron en 3' respecto al gen Colágeno-1. Se presentan la PCR de genotipado de muestras para el elemento Rosa-RTTA y las secuencias de ARNhc (COLTGM) y la electroforesis en gel de transferencia de Southern (Fig. 16A). La alimentación con doxiciclina (DOX) para inducir la atenuación de Shroom3 en ratones genotipados se inició 3 semanas antes de la cirugía de UUO y continuó hasta la fecha del sacrificio 10 días después. Para estudiar el desarrollo de la fibrosis intersticial renal, realizamos una cirugía de obstrucción ureteral unilateral (UUO) en animales de 8-10 semanas de edad después de 3 semanas de alimentación con DOX ($n=5$ en cada clon de ARNhc). Los ratones se sacrificaron 10 días después de la UUO. Se utilizaron como controles animales de ARNhc de SHROOM3 de la misma edad que no fueron alimentados con DOX. Los resultados se analizaron cuantitativamente mediante la prueba t para muestras desapareadas.

RESULTADOS

Los presentes inventores examinaron el impacto de la atenuación de SHROOM3 mediada por ARNhc sobre la señalización de TGF- β 1/SMAD3 y la fibrosis renal en la cepa de ratón de ARNhc inducible por DOX anterior. La alimentación de estos animales con doxiciclina (DOX) confirmó la atenuación de SHROOM3 (-75 %) a las 3 semanas (PCR en tiempo real (RT-PCR) y transferencia Western (WB) de lisados corticales renales) (Fig. 16B y 16D). Los animales alimentados con DOX mostraron fosforilación significativamente inhibida de SMAD3 en riñones UUO mediante transferencia Western (Fig. 16B). La producción de COL1A1 en riñones UUO se inhibió con la atenuación de Shroom3 como se muestra mediante RT-PCR de lisados de riñón y por inmunofluorescencia (IF) en secciones tisulares (Fig. 16C, panel inferior y gráfico; y 16D). La fibrosis intersticial renal medida mediante tinción con rojo picrosirio (Fig. 16C, panel central), se anuló significativamente en animales de Shroom3 atenuado. Estos resultados validan el papel de SHROOM3 en la señalización canónica de TGF- β 1.

DISCUSIÓN:

La nefropatía crónica del aloinjerto sigue siendo una causa importante de fracaso del aloinjerto y de TRR {Paul LC, 1999} {Chapman JR, 2005} {Racusen LC, 2010} {US-RDS 2012}. Las estrategias inmunosupresoras modernas han tenido un impacto significativo sobre los resultados de los aloinjertos a corto plazo con una mejora mucho menor en los resultados a largo plazo {Hariharan S, 2000} {Meier-Kriesche HU, 2004} {Lamb KE, 2011}. Además, CAN sigue siendo una entidad histológica con estadios arbitrarios y variabilidad entre los patólogos que notifican {Solez K, 2008} {Akalin E, 2010} {Ying L, 2009} {Halloran P, 2002}. Por tanto, la identificación de marcadores más nuevos para un diagnóstico y tratamiento potenciales tempranos de la CAN es imperativa. En el estudio GoCAR, los presentes inventores examinan la capacidad de los perfiles de expresión génica de aloinjertos a partir de biopsias de protocolo a los 3 meses para predecir el desarrollo de CAN y FTI a los 12 meses. Por tanto, los presentes inventores identificaron a Shroom3 como un nuevo gen candidato cuya expresión de aloinjerto precede y predice el desarreglo de la función renal y de FTI.

Si bien la CAN evolucionada ha mostrado distintivos transcripcionales diferentes en estudios previos {Flechner S, 2004} {Donauer J, 2003}, se han planteado cuestiones con respecto a su interpretación y generalización. El

desarrollo de biomarcadores y/o estrategias terapéuticas se ha visto obstaculizado por los grandes tamaños de los paneles de genes, los tamaños muestrales pequeños, las biopsias puntuales únicas, la heterogeneidad del ensayo de chip de genes utilizado y la baja fidelidad de las técnicas de amplificación de pre-matriz {Ying L, 2009} {Akalin E, 2010}. Los estudios basados en perfiles transcripcionales de biopsia por causa son menos fiables para desarrollar paneles predictivos o terapéuticos para CAN debido a la diversidad genética que depende de la patología en el momento de la biopsia. Para determinar un distintivo genético que predeciría el desarrollo de CAN, Scherer *et al.*, perfilaron el ARN amplificado (chip HG-U95Av2 de Affy) a partir de biopsias de protocolo de 6 meses de 17 pacientes, 12 de los cuales desarrollaron CAN. Desarrollaron un grupo de 10 genes que fue un 88 % predictivo del desarrollo de rechazo crónico a los 12 meses. Sin embargo, la relación no fue significativa cuando se analizaron genes individuales {Scherer A, 2003}. Los presentes inventores usaron ARN sin amplificar de biopsias de 3 meses y una matriz de chips de genes de exones completos (-4 sondas/exón, -40 sondas/gen) para correlacionar genes expresados diferencialmente con TFG_e y CAN a los 12 meses en la cohorte más grande de pacientes del presente estudio. Además, la expresión de Shroom3 en el presente estudio retuvo su significación cuando se analizó solo la cohorte completa con una mejor correlación en el subconjunto de DDR y RRDB. Esto se validó en la cohorte interna externa más pequeña de pacientes del presente estudio mediante RT-PCR. Cabe destacar que, los niveles medios de transcripción de Shroom3 fueron significativamente más altos en pacientes cuyas puntuaciones CADI progresaron (Delta CADI_≥2) entre 3 y 12 meses en comparación con aquellos con puntuaciones histológicas relativamente estables. Esto implica un papel de Shroom3 en la progresión de la fibrosis y CAN.

FTI es un criterio de valoración histológico común para CAN y ERC. En consecuencia, los genes relacionados con la fibrogénesis y la producción de la matriz EC, específicamente relacionados con la señalización de TGF-beta, han surgido como regulados diferencialmente a partir de estudios transcripcionales en pacientes con CAN y modelos animales de ERC {Flechner S, 2004} {Hotchkiss H, 2006} {Mas V, 2007} {Ju W, 2009}. Un SNP en Shroom3 ha surgido independientemente unido a ERC incidente y prevalente en cohortes predominantemente caucásicas {Kottgen A, 2009} {Böger C, 2011}. Sin embargo, la función del gen Shroom3 y su relación con la pérdida de TFG_e y FTI se desconocen hasta la fecha. En PRCEC, nuestros estudios de RT-PCR sugieren una pequeña pero significativa sobreproducción de marcadores de matriz EC (colágeno-dominio de fibronectina) por la sobreexpresión de Shroom3 y una marcada supresión de estos marcadores con la inhibición de Shroom3 mediada por ARNip. Además, la sobreexpresión de Shroom3 parece facilitar la señalización canónica de TGFbeta, como lo evidencia la fosforilación mejorada de Smad-3 en PRCEC. Coherente con esto es la respuesta amplificada de la producción de marcadores profibróticos (SNAIL, MMP-2, colágeno-1) tras el tratamiento con TGF-beta en células transfectadas con Shroom3 en comparación con los controles. También en línea con estas observaciones están los niveles suprimidos de P-Smad3 y Colágeno-1 que los presentes inventores observaron con ARNip de Shroom3 en células tratadas con TGF. TGF-beta también aumentó la expresión de Shroom3 en PRCEC. Otros grupos han hecho esta observación en células HK-2 usando secuenciación de ARN {Brennan EP}. Esto, junto con el efecto beneficioso del aumento de Shroom3 sobre la señalización de TGFbeta, puede indicar un bucle de retroalimentación positiva entre Shroom3 y TGF. Conjuntamente, estos sugieren que una mayor expresión de Shroom3 puede tener efectos profibróticos en las células epiteliales renales. Curiosamente, a partir de los datos de biopsias del presente estudio, tener una o dos copias del alelo de riesgo (A) en el donante parece aumentar significativamente los niveles de transcritos de Shroom3 en el tejido de la biopsia (~ 1,4 veces). No hubo asociación consistente entre el SNP del receptor y la expresión de Shroom3, lo que sugiere una pequeña contribución de la expresión de Shroom3 del aloinjerto de las células receptoras infiltradas. Resumiendo, esto implica que la asociación entre el SNP y la ERC en estudios previos de GWAS puede explicarse por el aumento de los niveles renales de Shroom3 y una respuesta profibrótica posterior que se acompaña con tener el alelo de riesgo.

En el análisis univariante la asociación entre la expresión de Shroom3 y TFG_e/CADI fue significativa en RRDB y DDR, pero no en no RRDB o LDR. De forma notable, de los DDR, 51/59 eran RRDB. La prevalencia alélica del efecto también fue significativamente mayor en los blancos en comparación con los no blancos en el presente análisis. Los estudios anteriores de GWAS que identificaron Shroom3 implicaron cohortes predominantemente caucásicas {Kottgen A, 2009} {Böger C, 2011}. En un estudio para identificar loci de susceptibilidad para la relación albúmina creatinina en orina (UACR; del inglés, urinary-albumin creatinine ratio), el SNP de Shroom3 retuvo la asociación con TFG_e y UACR en los blancos, pero no alcanzó importancia en los afroamericanos (AA) {Ellis JW, 2011}. En la observación del presente documento de la falta de asociación entre la expresión de Shroom3 y TFG_e/CADI en no blancos es similar a estos resultados publicados. La expresión de Shroom3 aumentada con la presencia del alelo A en el donante, sin embargo, también se observó en no RRDB. Además, la expresión media de Shroom3 mediante micromatrices no fue significativamente diferente entre RRDB y no RRDB (datos no mostrados). Por tanto, el efecto insignificante de Shroom3 sobre TFG_e/CADI en personas no blancas no está claro. Los no RRDB en la micromatriz (n=21) y RT-PCR (n=5) fueron menores que los RRDB. De forma más conjetural, un polimorfismo que tiene un mayor impacto en los resultados del aloinjerto en no RRDB que no los presentes inventores no analizaron puede estar distribuido de manera diferente dentro de esta cohorte. En las cohortes notificadas en el presente documento, los estadounidenses de origen europeo con ERET diabética y ERC, respectivamente, tenían la mayor prevalencia del alelo de riesgo de rs17319721. Sin embargo, el estudio de investigación en familias con nefropatía y diabetes (en inglés, Family Investigation of Nephropathy and Diabetes, FIND) no notificó una vinculación entre los loci en el cromosoma 4 y la nefropatía diabética en caucásicos {Igo RP, 2011}. La incoherencia entre estos resultados puede provenir del grupo de comparación del presente estudio, que incluyó solo a donantes de riñón que no estaban relacionados.

Ninguno de los pacientes en la micromatriz de 3 meses tuvo biopsias para la evaluación de resultados a los 12 meses (17 pérdidas de aloinjerto, 42 pérdida del seguimiento o rechazaron la biopsia de 12 meses). El tamaño de la muestra de 101 pacientes sigue siendo robusto en comparación con estudios transcripcionales previos en receptores de aloinjertos {Flechner S, 2004} {Donauer J, 2003} {Sarwal M, 2003} {Reeve J, 2009}. Solo 36 pacientes tenían ARN de calidad suficiente para la validación de RT-PCR después de las micromatrices, aunque las relaciones fueron significativas dentro de esta muestra. Si bien la facilitación de la señalización de TGF-beta por exceso de Shroom3 se observó *in vitro*, el mecanismo de esta interacción es incierto. Se ha demostrado que el dominio ASD-2 C-terminal de Shroom3 es esencial para el reclutamiento y la función de las Rho-quinasas 1 y 2 (ROCK) en el tubo neural invaginable. La mutación de este dominio conduce a la pérdida de la función ROCK {Nishimura, 2008}. En condrocitos, las ROCK facilitaron y el inhibidor de ROCK (Y27632) inhibió la fosforilación de Smad3 con el tratamiento con TGF-beta {Xu T, 2012}. Además, en modelos animales de obstrucción ureteral unilateral, los inhibidores de ROCK retardaron la fibrosis intersticial renal y la disminución de la TFG {Sato S, 2002} {Nagatoya K, 2002} {Takeda Y, 2010}. Aunque los presentes inventores no analizaron esto, el mecanismo de interacción con TGF-beta puede ser en parte a través de la facilitación de ROCK mediada por Shroom3. Por último, el locus rs17319721 en el gen Shroom3 es intrónico, entre los exones 1 y 2. La razón de los aparentes efectos regulatorios de esta región es menos clara a partir de las observaciones de los presentes inventores. Recientemente, se han publicado secuencialmente los resultados del consorcio de la enciclopedia de elementos de ADN (en inglés, Encyclopedia of DNA elements, ENCODE) que describen las funciones reguladoras asociadas a los loci intrónicos dentro del genoma humano {Dunham I, 2012} {Neph S, 2012} {Gerstein M, 2012}. Los estudios que utilizan el mapeo de metilación de histonas sugieren que el SNP de Shroom3 está situado en un área que se predice que tiene una función potenciadora {Dra. Katalina Susztak, ASN 2012}. Esto es coherente con los hallazgos de los presentes inventores.

Resumiendo, Shroom3 es un nuevo gen candidato cuya expresión en el aloinjerto renal precede y predice el desarreglo de la función renal y de FTI en CAN. Unos niveles más altos de Shroom3 de aloinjerto parecen predecir la progresión histológica de CAN. Los presentes inventores también demuestran que estas relaciones son mejores en receptores de riñones de donantes blancos y de riñones de donantes fallecidos. Los hallazgos de los presentes inventores confirman por primera vez que el locus de Shroom3 (rs17319721) asociado a ERC descrito anteriormente {Kottgen A, 2009} {Böger C, 2011} media su efecto a través de la expresión de Shroom3 aumentada. Finalmente, los estudios de los presentes inventores *in vitro* sugieren un papel beneficioso para Shroom3 en la señalización canónica de TGF-beta y la producción de colágeno tipo I promete como una diana terapéutica tanto en CAN como en ERC para reducir la progresión de FTI y retardar la ERET.

Se describe adicionalmente un kit para utilizar en la identificación de pacientes que padecen enfermedades renales y para predecir la progresión de la fibrosis renal y FTI en receptores de aloinjertos renales. El kit consiste en reactivos para el análisis de RT-PCT de expresión de Shroom 3 y un microensayo para detectar el alelo de riesgo de SNP de rs 17319721, un control positivo para los ensayos de RT-PCR, tampones e instrucciones de uso. El kit se utiliza obteniendo una biopsia renal de un paciente que recibió un trasplante de riñón de un donante, determinando la expresión de Shroom 3 y comparando un nivel de expresión de Shroom 3 en el espécimen de biopsia con el nivel de expresión de Shroom 3 en el control positivo del kit, todo mediante RT-PCR. La micromatriz se utiliza para identificar donantes de riñón que son homocigotos para el alelo A de Shroom 3.

REFERENCIAS:

Coresh, J, Selvin, E, Stevens, LA, Manzi, J, Kusek, JW, Eggers, P, Van Lente, F and Levey, AS: Prevalence of chronic kidney disease in the United States. JAMA, 298: 2038-47, 2007.

Weiner, DE, Tighiouart, H, Amin, MG, Stark, PC, MacLeod, B, Griffith, JL, Salem, DN, Levey, AS and Sarnak, MJ: Chronic kidney disease as a risk factor for cardiovascular disease and all-cause mortality: a pooled analysis of community-based studies. J Am Soc Nephrol, 15: 1307-15, 2004.

Chapman, JR, O'Connell, PJ and Nankivell, BJ: Chronic renal allograft dysfunction. J Am Soc Nephrol, 16: 3015-26, 2005.

Isoniemi HM, Krogerus L, von Willebrand E, Taskinen E, Ahonen J, Häyry P. Histopathological findings in well-functioning, long-term renal allografts. Kidney Int. 1992 Jan;41(1):155-60.

Yilmaz S, McLaughlin K, Paavonen T, Taskinen E, Monroy M, Aavik E, Vamvakopoulos J, Hayry P. Clinical predictors of renal allograft histopathology: a comparative study of single-lesion histology versus a composite, quantitative scoring system. Transplantation. 2007 Mar 27;83(6):671-6.

Magee JC, Barr ML, Basadonna GP, et al. Repeat Organ Transplantation in the United States, 1996-2005. American Journal of Transplantation 2007; 7 (Parte 2): 1424-1433

USRDS 2012. http://www.usrds.org/2012/pdf/v2_ch7_12.pdf

- Gago M, Cornell LD, Kremers WK, Stegall MD, Cosio FG. Kidney allograft inflammation and fibrosis, causes and consequences. *Am J Transplant*. 2012 May;12(5):1199-207.
- 5 Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, Schroeder TJ, Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation* 1994; 57: 208-211.
- Seron D, Moreso F, Bover J, *et al*. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997; 51: 310-316.
- 10 Cosio FG, Grande JP, Larson TS, *et al*. Kidney allograft fibrosis and atrophy early after living donor transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5: 1130-1136.
- Park WD, Griffin MD, Cornell LD, Cosio FG, Stegall MD. Fibrosis with inflammation at one year predicts transplant functional decline. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1987-1997.
- 15 Akalin E, O'Connell PJ. Genomics of chronic allograft injury. *Kidney Int Suppl*. 2010 Dec;(119):S33-7.
- Akalin E, Hendrix RC, Polavarapu RG *et al*. Gene expression analysis in human renal allograft biopsy samples using high-density oligoarray technology. *Transplantation* 2001; 72: 948-953.
- 20 Flechner SM, Kurian SM, Head SR, Sharp SM, Whisenant TC, Zhang J, Chismar JD, Horvath S, Mondala T, Gilmartin T, Cook DJ, Kay SA, Walker JR, Salomon DR. Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. *Am J Transplant*. 2004 Sep;4(9): 1475-89.
- 25 Donauer J, Rumberger B, Klein M, Faller D, Wilpert J, Sparna T, Schieren G, Rohrbach R, Dem P, Timmer J, Pisarski P, Kirste G, Walz G (2003) Expression profiling on chronically rejected transplant kidneys. *Transplantation* 76:539-547
- 30 Sarwal M, Chua MS, Kambham N, Hsieh SC, Satterwhite T, Masek M, Salvatierra O Jr. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med*. 2003 Jul 10;349(2):125-38.
- Reeve J, Einecke G, Mengel M, Sis B, Kayser N, Kaplan B, Halloran PF. Diagnosing rejection in renal transplants: a comparison of molecular- and histopathology-based approaches. *Am J Transplant*. 2009 Aug;9(8):1802-10. Epub 10 de junio de 2009
- 35 Scherer A, Krause A, Walker JR, Korn A, Niese D, Raulf F. Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. *Transplantation*. 2003 Apr 27;75(8): 1323-30.
- 40 Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, Chapman S, Craciun L, Sergeant R, Brouard S, Rovis F, Jimenez E, Ballow A, Giral M, Rebollo-Mesa I, Le Moine A, Braudeau C, Hilton R, Gerstmayr B, Bourcier K, Sharif A, Krajewska M, Lord GM, Roberts I, Goldman M, Wood KJ, Newell K, Seyfert-Margolis V, Warrens AN, Janssen U, Volk HD, Souillou JP, Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010 Jun;120(6):1848-61.
- 45 Newell KA, *et al*. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010; 120(6):1836-1847.
- 50 Ju W, Eichinger F, Bitzer M, Oh J, McWeeney S, Berthier CC, Shedden K, Cohen CD, Henger A, Krick S, Kopp JB, Stoeckert CJ Jr, Dikman S, Schröppel B, Thomas DB, Schlondorff D, Kretzler M, Böttinger EP. Renal gene and protein expression signatures for prediction of kidney disease progression. *Am J Pathol*. 2009 Jun;174(6):2073-85.
- 55 Köttgen, A, Glazer, NL, Dehghan, A, Hwang, SJ, Katz, R, Li, M, Yang, Q, Gudnason, V, Launer, LJ, Harris, TB, Smith, AV, Arking, DE, Astor, BC, Boerwinkle, E, Ehret, GB, Ruczinski, I, Scharpf, RB, Chen, YD, de Boer, IH, Haritunians, T, Lumley, T, Samak, M, Siscovick, D, Benjamin, EJ, Levy, D, Upadhyay, A, Aulchenko, YS, Hofman, A, Rivadeneira, F, Uitterlinden, AG, van Duijn, CM, Chasman, DI, Pare, G, Ridker, PM, Kao, WH, Witteman, JC, Coresh, J, Shlipak, MG and Fox, CS: Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nat Genet*, 41: 712-7, 2009
- 60 Böger, CA, Gorski, M, Li, M, Hoffmann, MM, Huang, C, Yang, Q, Teumer, A, Krane, V, O'Seaghdha, CM, Kutalik, Z, Wichmann, HE, Haak, T, Boes, E, Coassin, S, Coresh, J, Kollerits, B, Haun, M, Paulweber, B, Köttgen, A, Li, G, Shlipak, MG, Powe, N, Hwang, SJ, Dehghan, A, Rivadeneira, F, Uitterlinden, A, Hofman, A, Beckmann, JS, Kramer, BK, Witteman, J, Bochud, M, Siscovick, D, Rettig, R, Kronenberg, F, Wanner, C, Thadani, RI, Heid, IM, Fox, CS and Kao, WH: Association of eGFR-Related Loci Identified by GWAS with Incident CKD and ESRD.
- 65

PLoS Genet, 7: e1002292. 2011

Hildebrand, JD and Soriano, P: Shroom, a PDZ domain-containing actin-binding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice. *Cell*, 99: 485-97, 1999.

Hildebrand, JD: Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network. *J Cell Sci*, 118: 5191-203, 2005.

Nishimura, T and Takeichi, M: Shroom3-mediated recruitment of Rho kinases to the apical cell junctions regulates epithelial and neuroepithelial planar remodeling. *Development*, 135: 1493-502, 2008.

Jin Y, Ratnam K, Chuang PY, Fan Y, Zhong Y, Dai Y, Mazloom AR, Chen EY, D'Agati V, Xiong H, Ross MJ, Chen N, Ma'ayan A, He JC. A systems approach identifies HIPK2 as a key regulator of kidney fibrosis. *Nat Med*. 2012 Mar 11;18(4):580-8. doi: 10.1038/nm.2685

Gassmann, M., Grenacher, B., Rohde, B., and Vogel, J. (2009) Quantifying Western blots. Pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* 30, 1845-1855

Henderson AR. Testing experimental data for univariate normality. *Clin CChem Act*. 2006 Apr;366(1-2):112-29. Epub 4 de enero de 2006.

Paul LC. Chronic allograft nephropathy: an update. *Kidney Int* 1999; 56(3): 783.

Racusen LC, Regele H. The pathology of chronic allograft dysfunction. *Kidney Int Suppl*. 2010 Dec;(119):S27-32. Review.

Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med*. 2000 Mar 2;342(9):605-12.

Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*. 2003 Dec 11;349(24):2326-33.

Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant*. 2004 Aug;4(8):1289-95.

Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant*. 2011 Mar;11(3):450-62. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03283.x. Epub 25 de octubre de 2010.

Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickleleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*. 2008 Apr;8(4):753-60. Epub 19 de febrero de 2008.

Halloran PF. Call for revolution: a new approach to describing allograft deterioration. *Am J Transplant* 2002; 2(3): 195.

Ying L, Sarwal M. In praise of arrays. *Pediatr Nephrol* (2009) 24:1643-1659.

Iglehart JK. Bundled payment for ESRD—including ESAs in Medicare's dialysis package. *N Engl J Med*. 17 de febrero de 2011; 364(7):593-5.

Hotchkiss H, Chu TT, Hancock WW, Schröppel B, Kretzler M, Schmid H, Liu Y, Dikman S, Akalin E (2006) Differential expression of profibrotic and growth factors in chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 81:342-349.

Ju W, Eichinger F, Bitzer M, Oh J, McWeeney S, Berthier CC, Shedden K, Cohen CD, Henger A, Krick S, Kopp JB, Stoeckert CJ Jr, Dikman S, Schroppel B, Thomas DB, Schlondorff D, Kretzler M, Böttinger EP. Renal gene and protein expression signatures for prediction of kidney disease progression. *Am J Pathol*. 2009 Jun;174(6):2073-85.

Mas V, Maluf D, Archer K, Yanek K, Mas L, King A, Gibney E, Massey D, Cotterell A, Fisher R, Posner M (2007) Establishing the molecular pathways involved in chronic allograft nephropathy for testing new noninvasive diagnostic markers. *Transplantation* 83:448-457.

Brennan EP, Morine MJ, Walsh DW, Roxburgh SA, Lindenmeyer MT, Brazil DP, Gaora PO, Roche HM, Sadlier DM, Cohen CD; GENIE Consortium, Godson C, Martin F. Next-generation sequencing identifies TGF- β 1-associated gene expression profiles in renal epithelial cells reiterated in human diabetic nephropathy. *Biochim Biophys Acta*. Abril 2012; 1822 (4):589-99. Epub 14 de enero de 2012.

Ellis JW, Chen MH, Foster MC, Liu CT, Larson MG, de Boer I, Köttgen A, Parsa A, Bochud M, Böger CA, Kao L, Fox CS, O'Seaghdha CM; CKDGen Consortium; CARE Renal Consortium. Validated SNPs for eGFR and their associations with albuminuria. *Hum Mol Genet*. 2012 Jul 15;21(14):3293-8. doi: 10.1093/hmg/dds138. Epub 5 de abril de 2012.

Okada Y, Sim X, Go MJ, *et al*. Meta-analysis identifies multiple loci associated with kidney function-related traits in east Asian populations. *Nat Genet*. 2012 Jul 15;44(8):904-9. doi: 10.1038/ng.2352.

Igo RP Jr, Iyengar SK, Nicholas SB, *et al*. Genomewide linkage scan for diabetic renal failure and albuminuria: the FIND study. *Am J Nephrol*. 2011;33(5):381-9. Epub 31 de marzo de 2011.

Xu T, Wu M, Feng J, Lin X, Gu Z. RhoA/Rho kinase signaling regulates transforming growth factor- β 1-induced chondrogenesis and actin organization of synovium-derived mesenchymal stem cells through interaction with the Smad pathway. *Int J Mol Med*. 2012 Nov;30(5):1119-25.

Satoh S, Yamaguchi T, Hitomi A, Sato N, Shiraiwa K, Ikegaki I, Asano T, Shimokawa H. Fasudil attenuates interstitial fibrosis in rat kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Eur J Pharmacol* 2002; 455: 169-174

Nagatoya K, Moriyama T, Kawada N, Takeji M, Oseto S, Murozono T, Ando A, Imai E, Hori M. Y-27632 prevents tubulointerstitial fibrosis in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 2002; 61: 1684-1695

Takeda Y, Nishikimi T, Akimoto K, Matsuoka H, Ishimitsu T. Beneficial effects of a combination of Rho-kinase inhibitor and ACE inhibitor on tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *Hypertens Res*. 2010 Sep;33(9):965-73. Epub 22 de julio de 2010

ENCODE Project Consortium- Dunham I, *et al*. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012 Sep 6;489(7414):57-74. doi: 10.1038/nature11247.

Neph S, Vierstra J, Stergachis AB, *et al*. An expansive human regulatory lexicon encoded in transcription factor footprints. *Nature*. 2012 Sep 6;489(7414):83-90. doi: 10.1038/nature11212.

Gerstein MB, Kundaje A, Hariharan M, *et al*. Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data. *Nature*. 2012 Sep 6;489(7414):91-100. doi: 10.1038/nature11245.

La presente invención no se limita en su alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento. En efecto, diversas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y las figuras acompañantes.

Además, debe entenderse que todos los valores son aproximados y que se proporcionan con fines descriptivos. Las patentes, solicitudes de patente, publicaciones, descripciones de productos y protocolos, se citan a lo largo de esta solicitud.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar el riesgo de desarrollar una nefropatía crónica del aloinjerto (CAN) en un paciente que ha recibido un trasplante de riñón de un donante, que comprende:
- 5 identificar la raza del donante;
 determinar los niveles de expresión de Shroom3 en un espécimen de biopsia de riñón obtenido del paciente;
 comparar el nivel de expresión de Shroom3 en el espécimen de biopsia con los niveles de expresión de SHROOM 3 en un control, que es una muestra de riñón normal;
- 10 determinar si el nivel de expresión de Shroom3 en el aloinjerto es significativamente mayor que en el control y diagnosticar que el paciente está en riesgo de CAN si (i) el nivel de expresión de SHROOM 3 en el espécimen es significativamente mayor que en el control;
 y (ii) el donante es caucásico.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, donde dichos niveles de expresión de Shroom3 se determinan mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
3. Un agente inmunosupresor para utilizar en el tratamiento de un paciente con diagnóstico de estar en riesgo de CAN de acuerdo con el método de la reivindicación 1.
- 20 4. El agente inmunosupresor para el uso de la reivindicación 3, donde dicho agente inmunosupresor es ciclosporina.
5. Un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina para utilizar en el tratamiento de un paciente con diagnóstico de estar en riesgo de CAN de acuerdo con el método de la reivindicación 1.
- 25

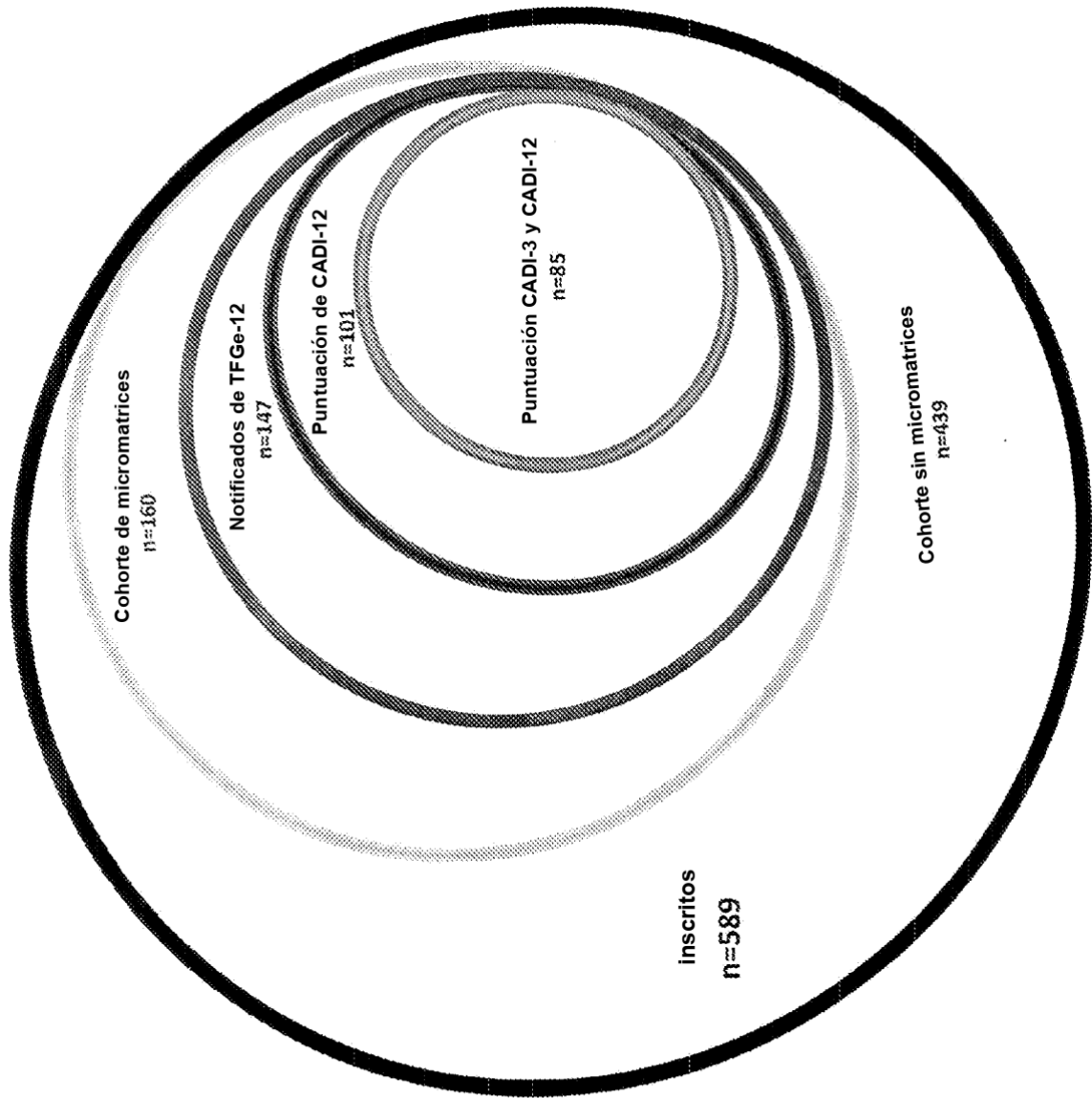
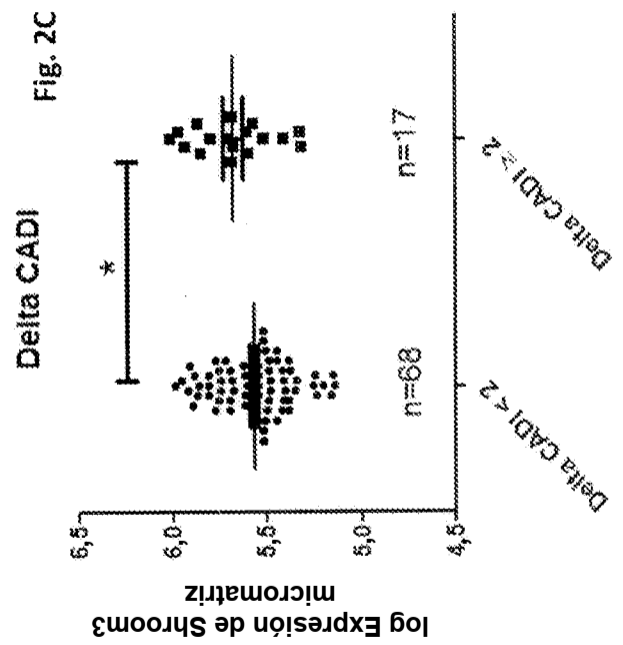
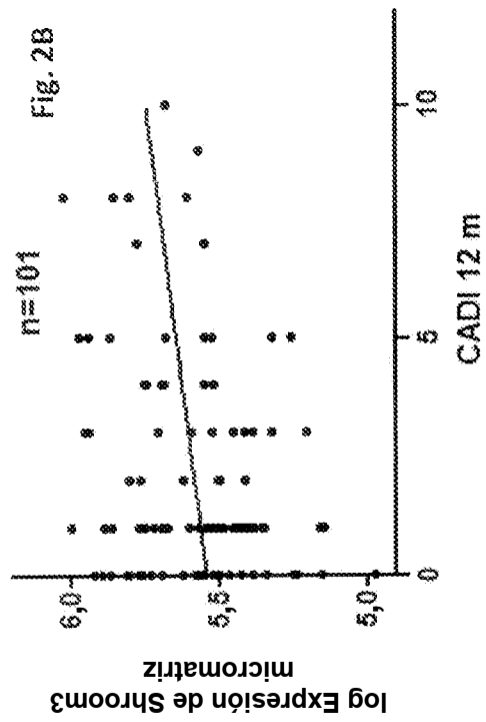
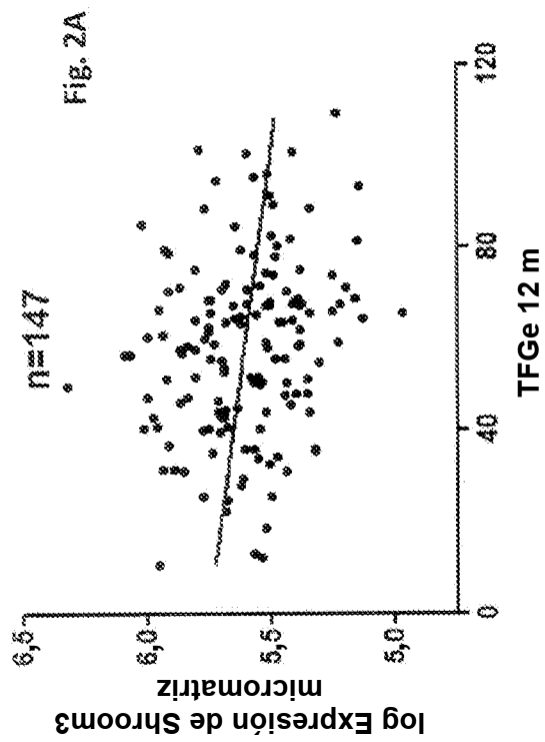
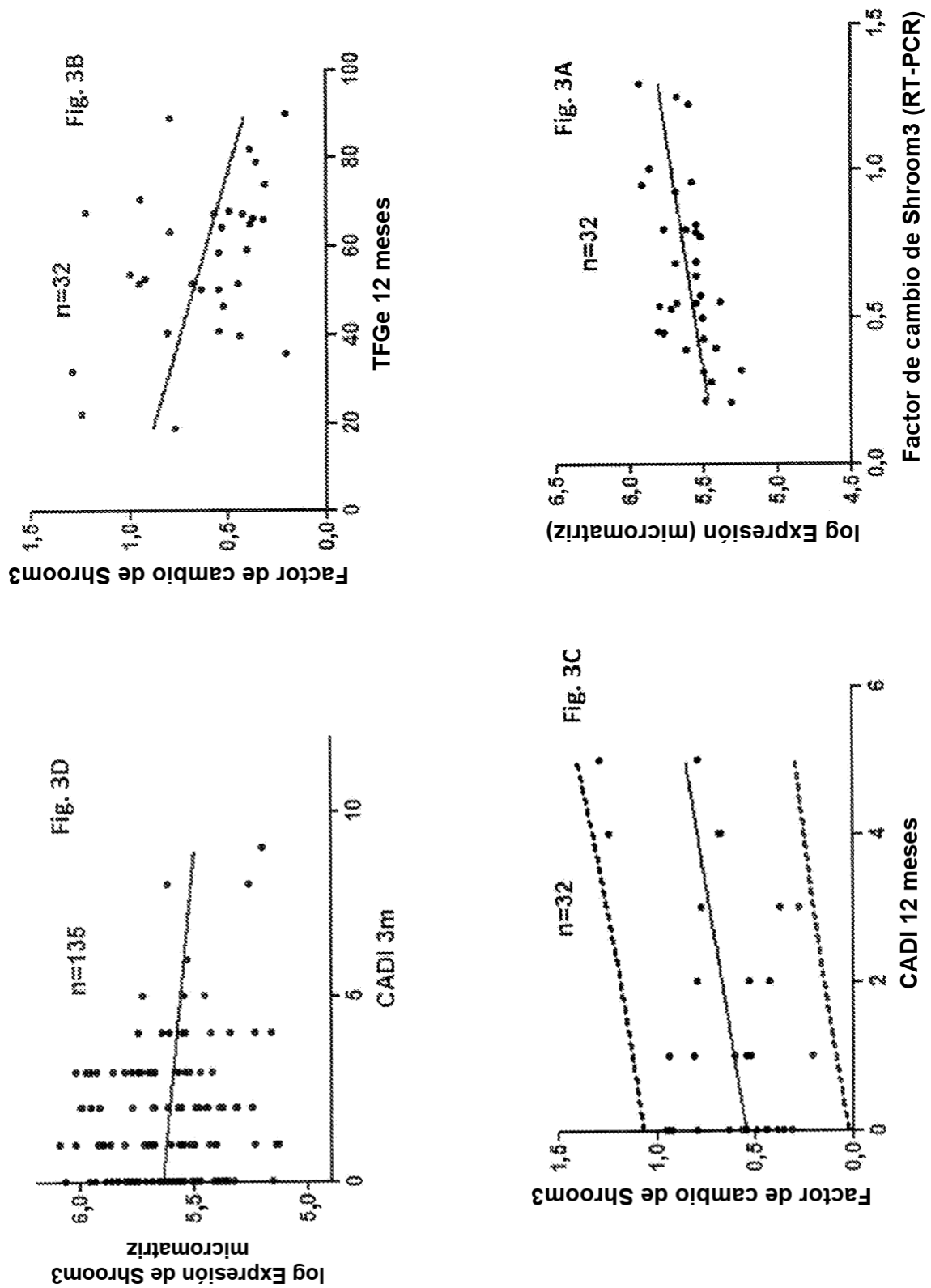
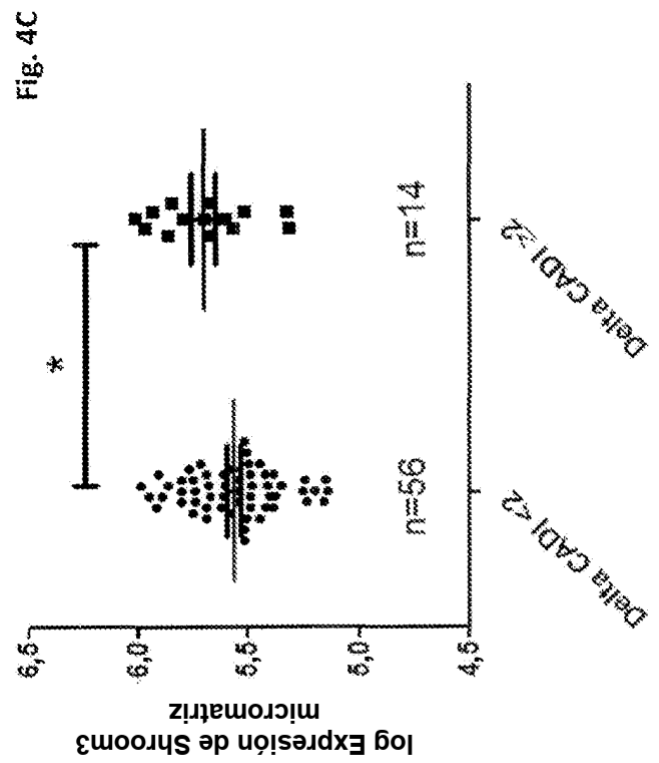
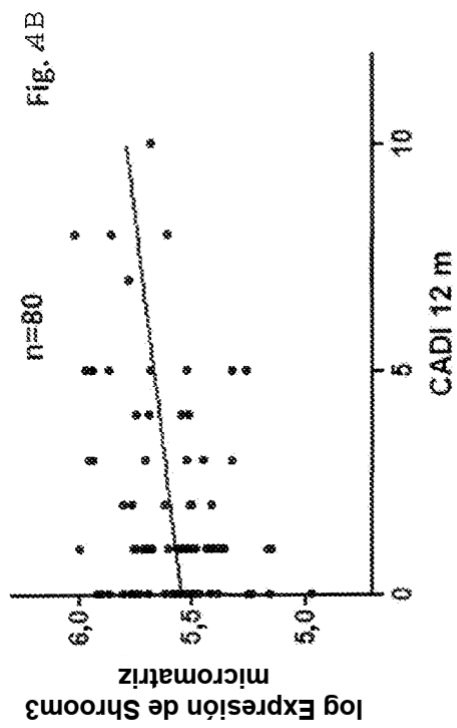
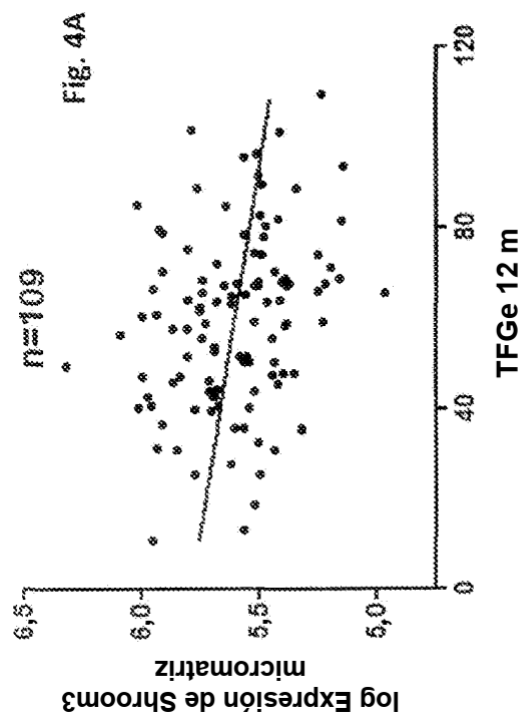
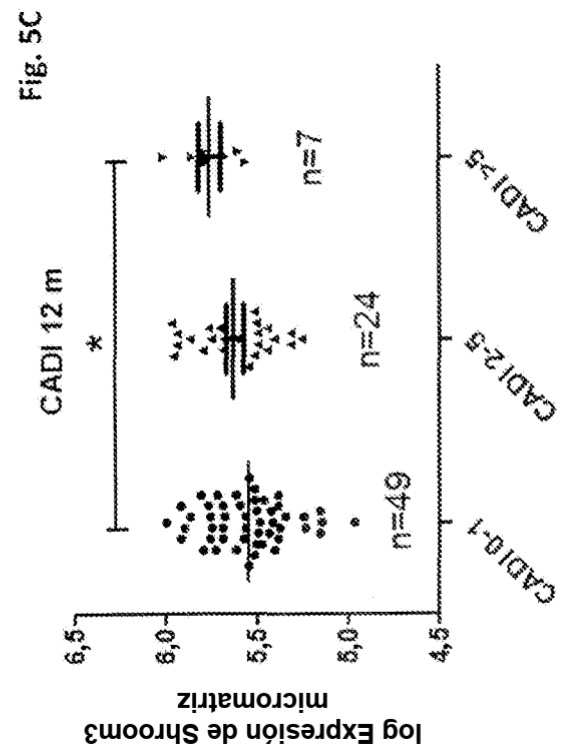
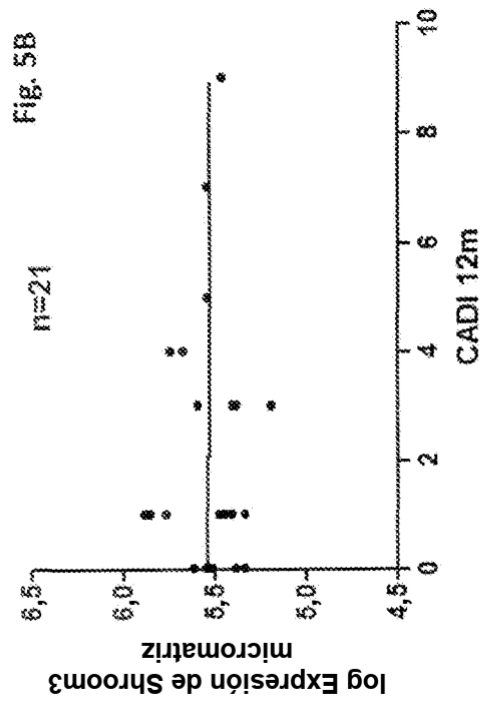
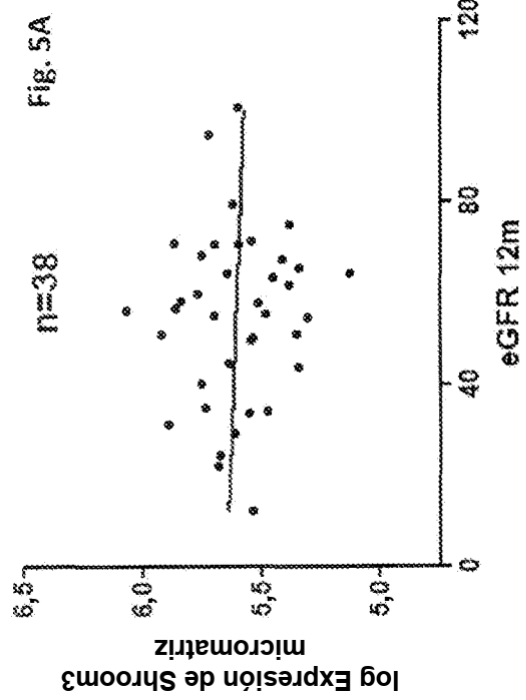


Fig. 1









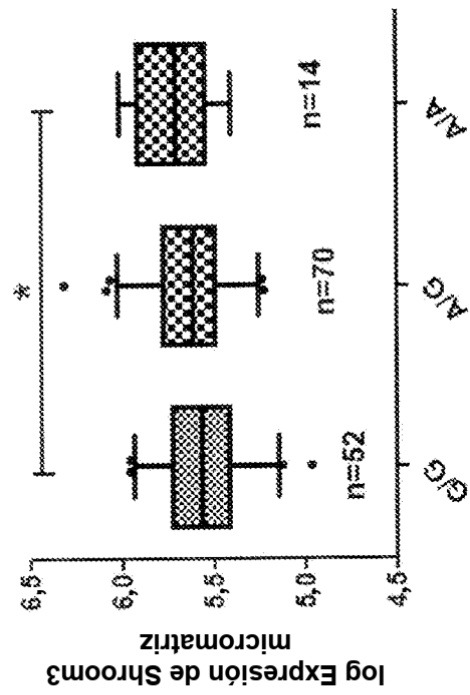


Fig. 6B

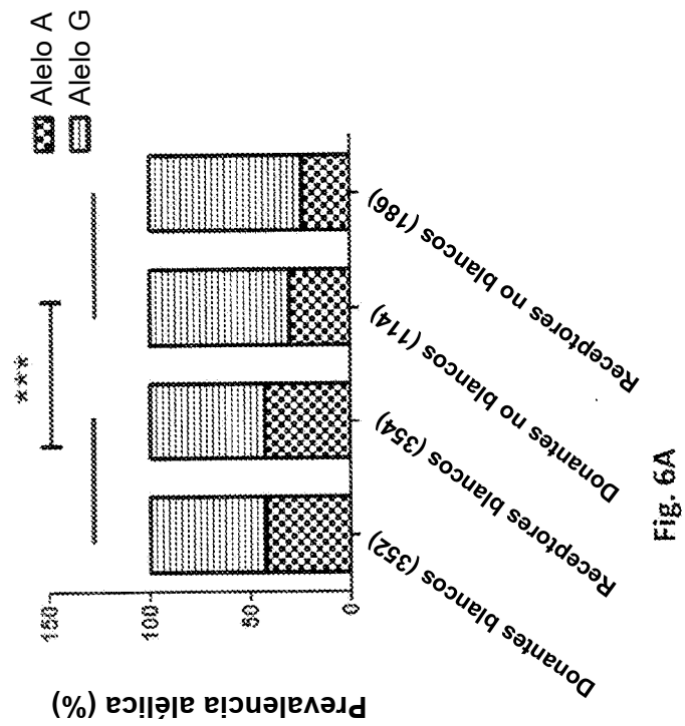
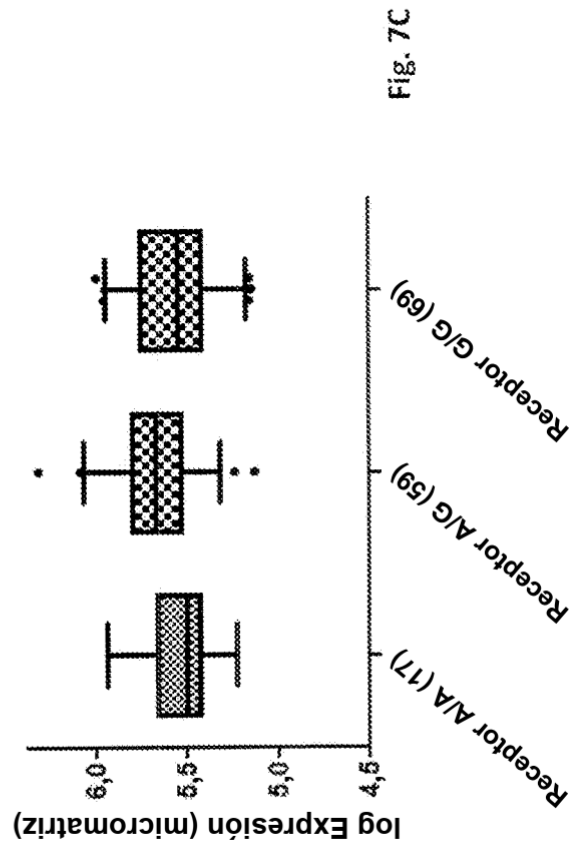
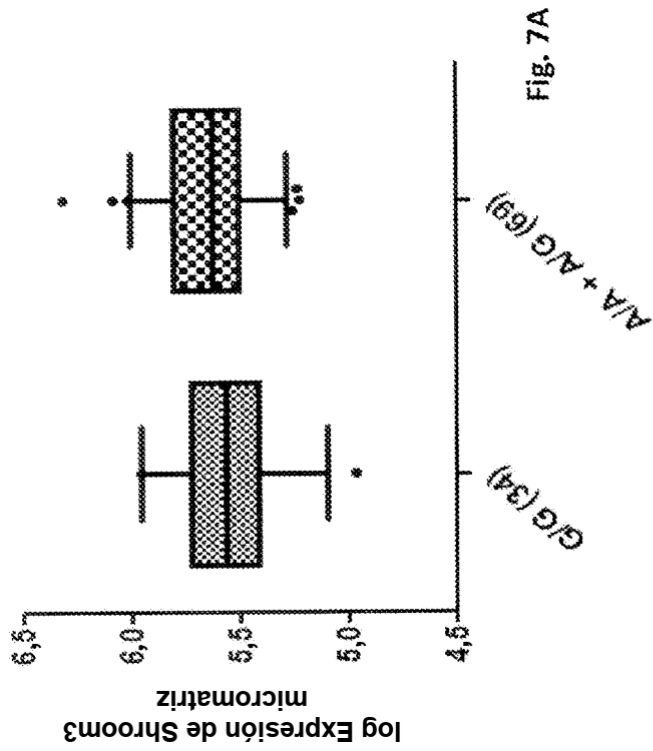
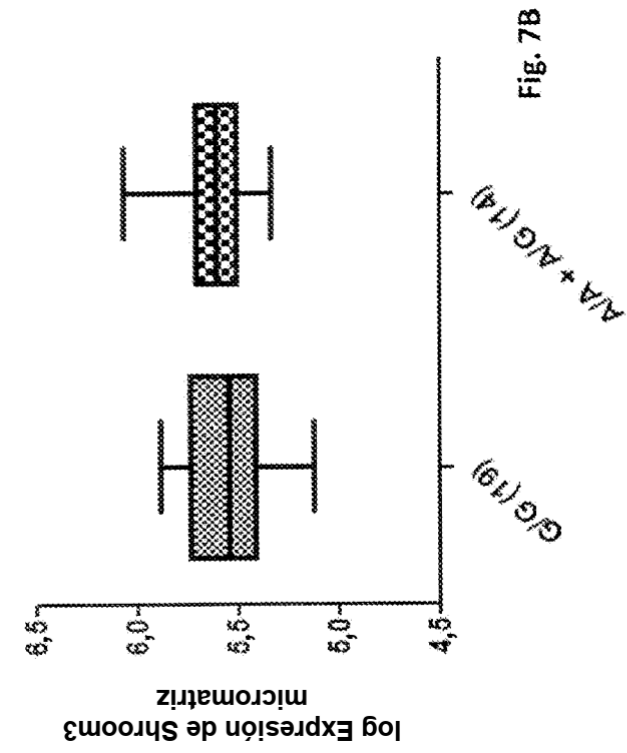


Fig. 6A



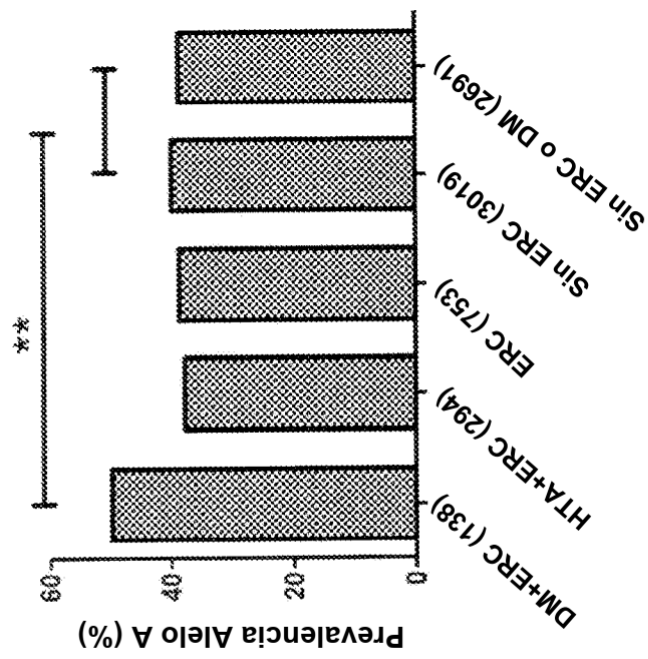


Fig. 8B

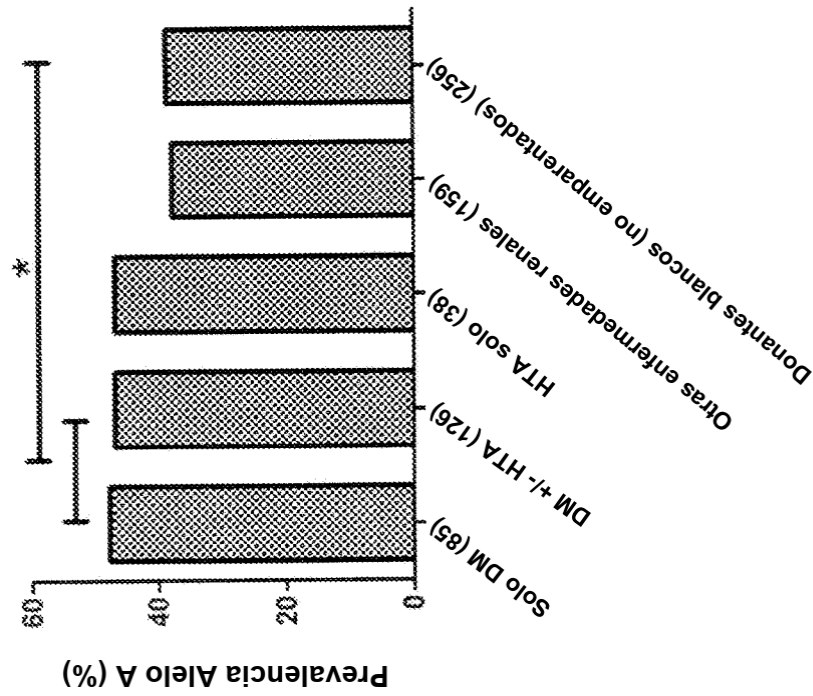
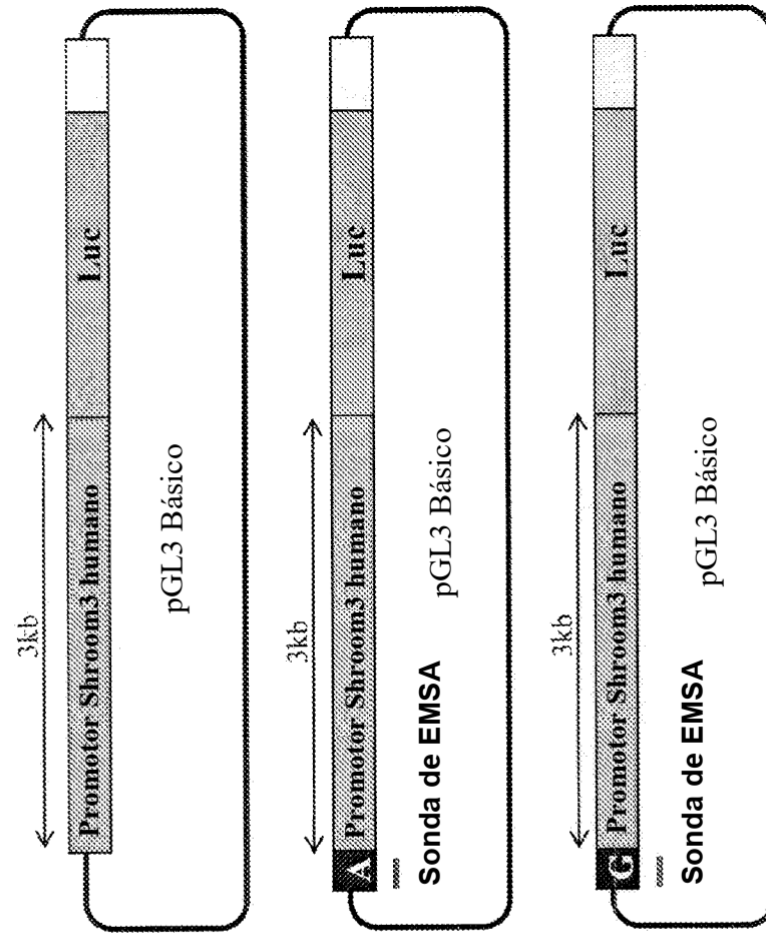
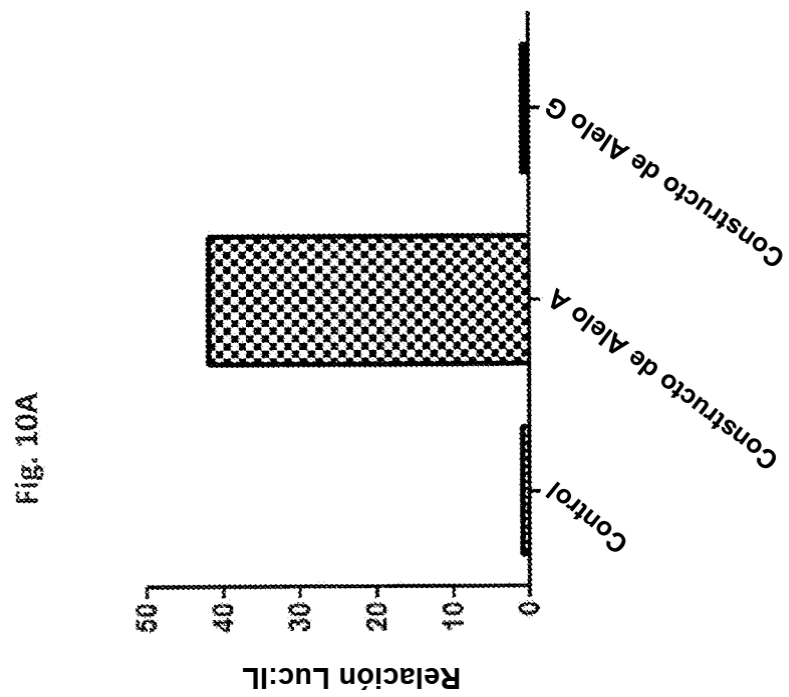
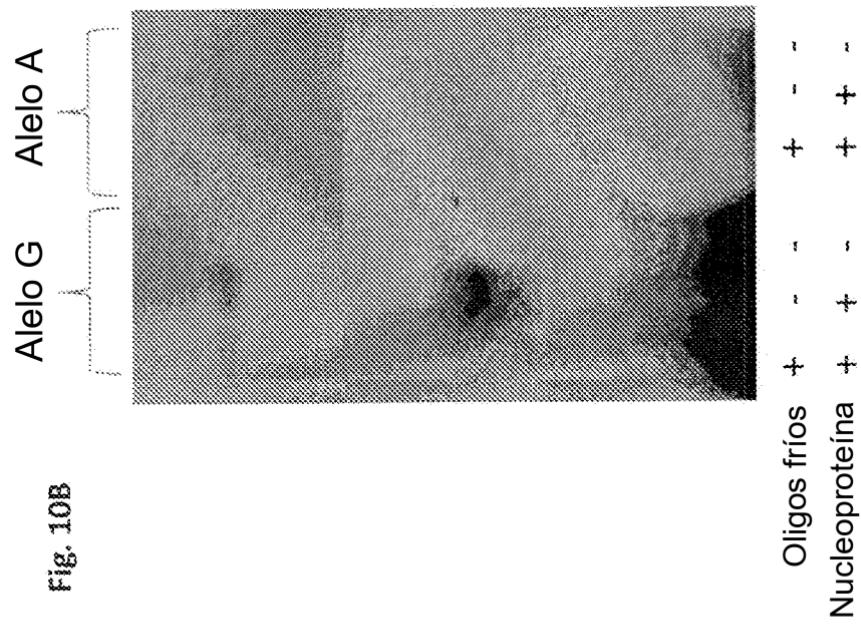


Fig. 8A

Fig. 9





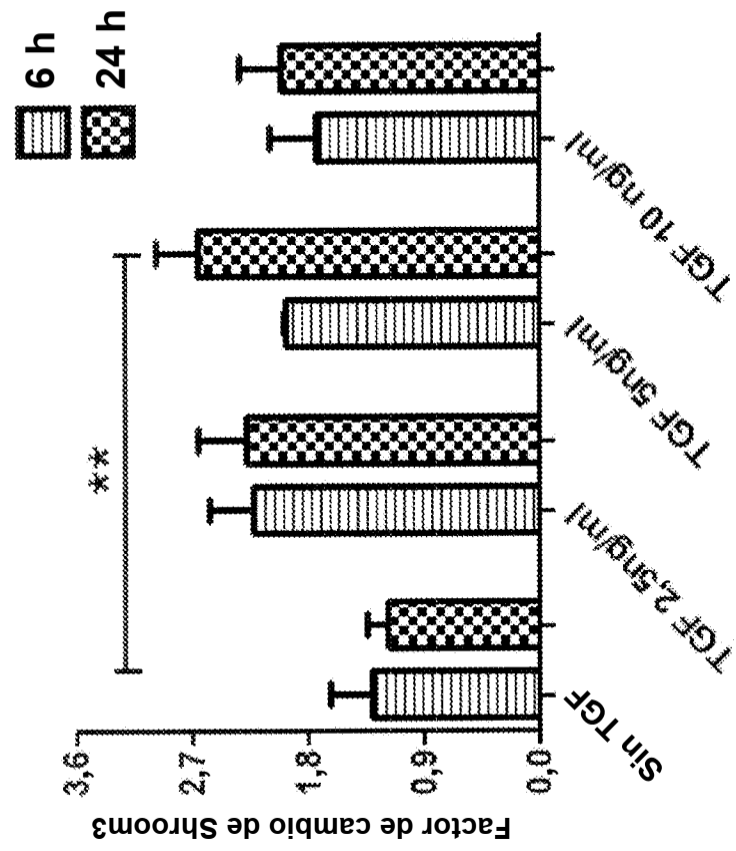
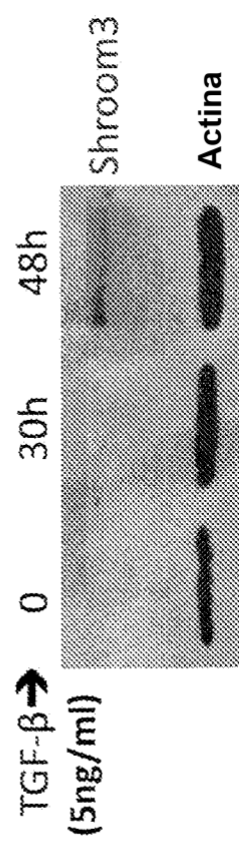


Fig. 11A

Fig. 11B



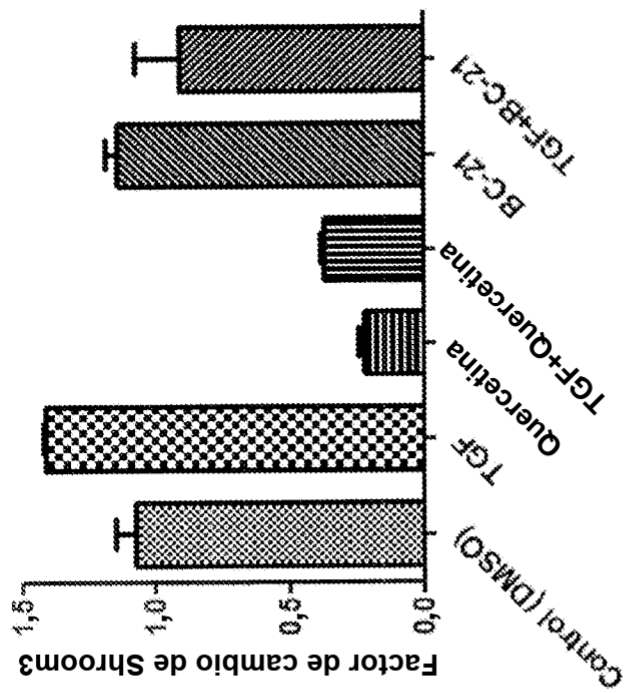
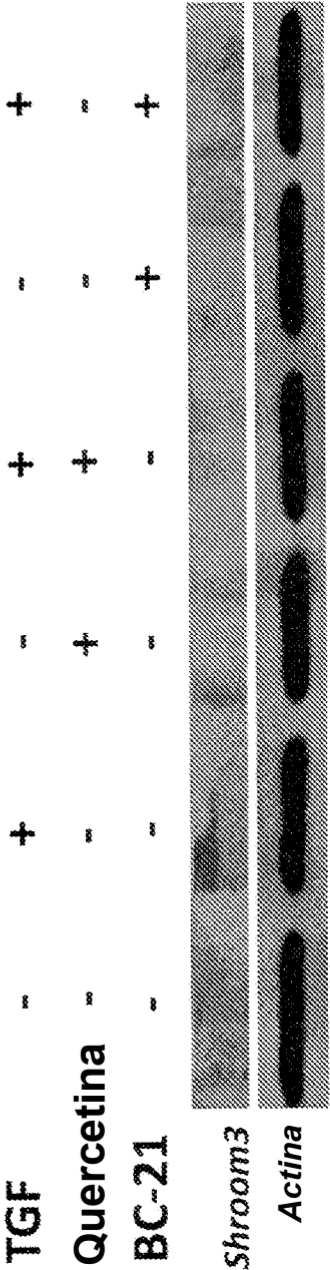


Fig. 12A

Fig. 12B



Sobreexpresión de Shroom3 en PCEC

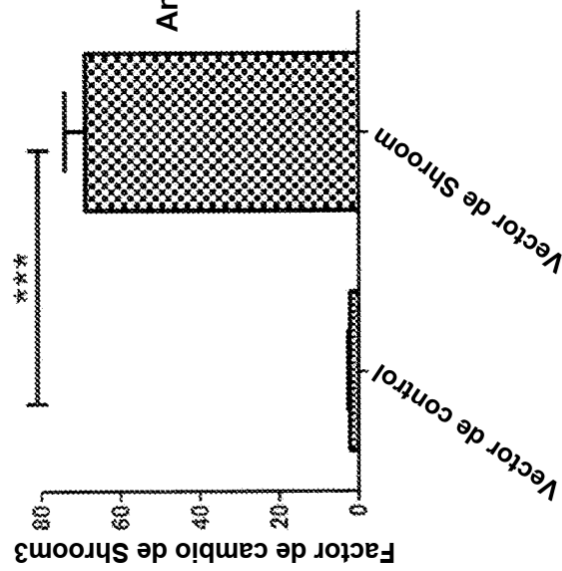


Fig. 13A

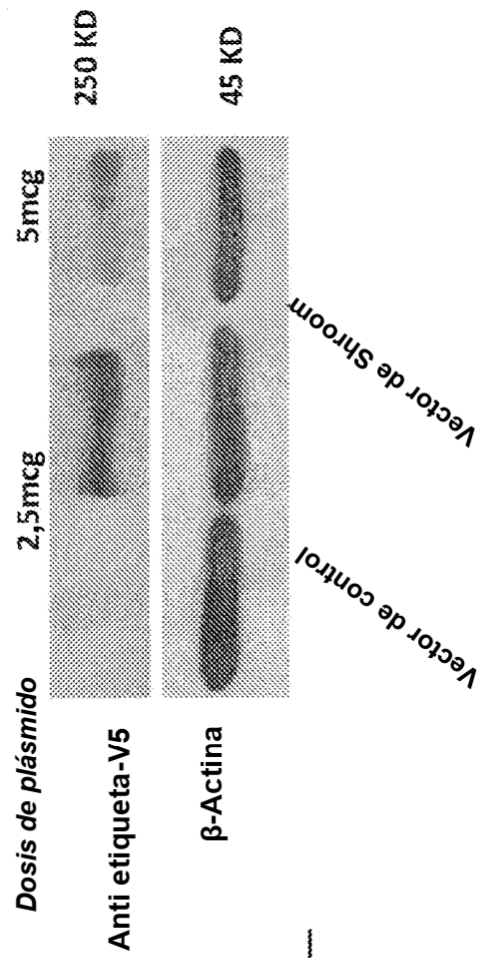


Fig. 13B

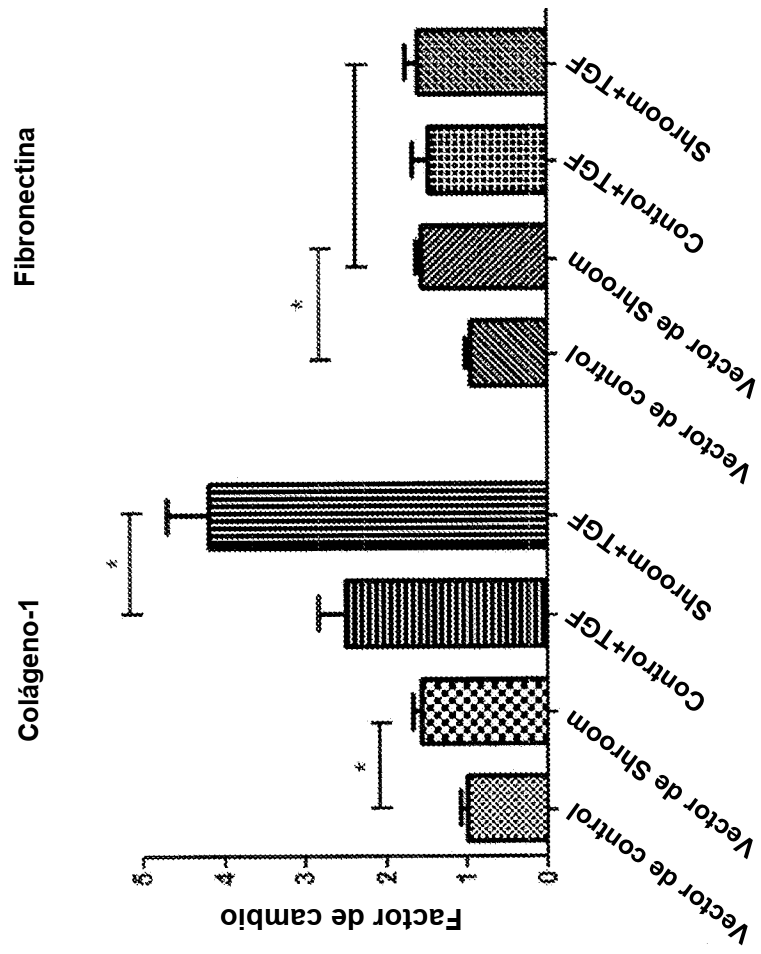


Fig. 14A

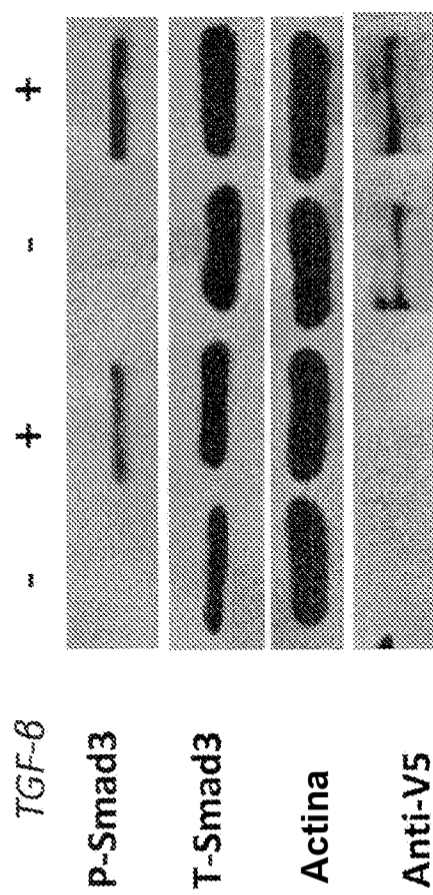
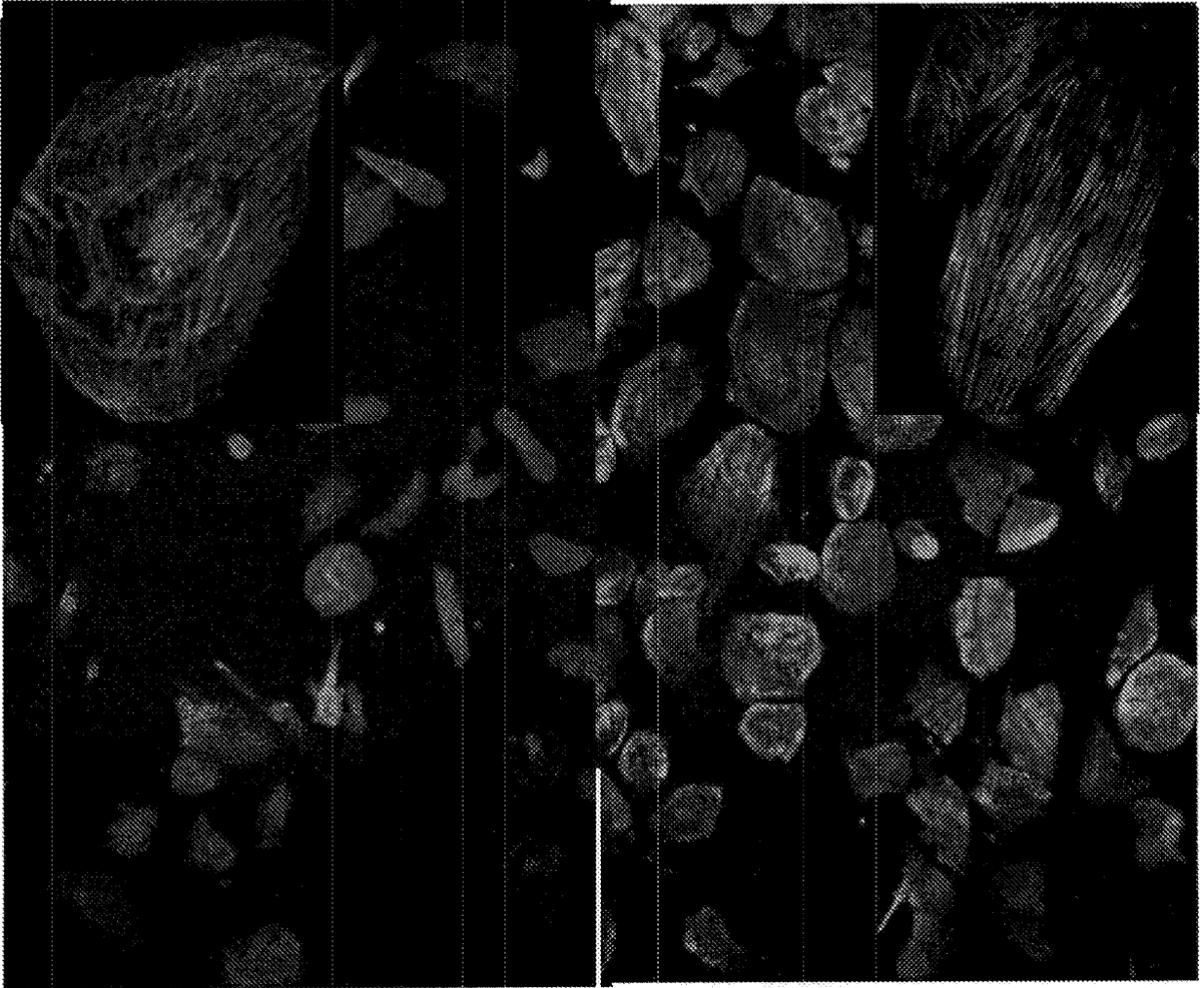


Fig. 14B

Fig.14C



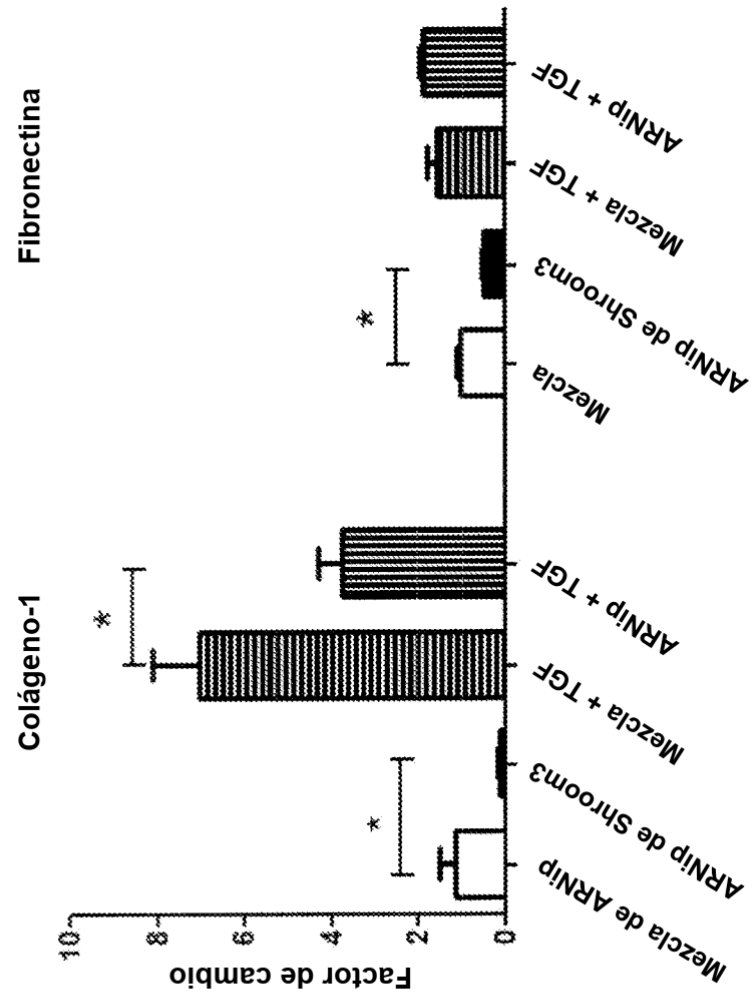
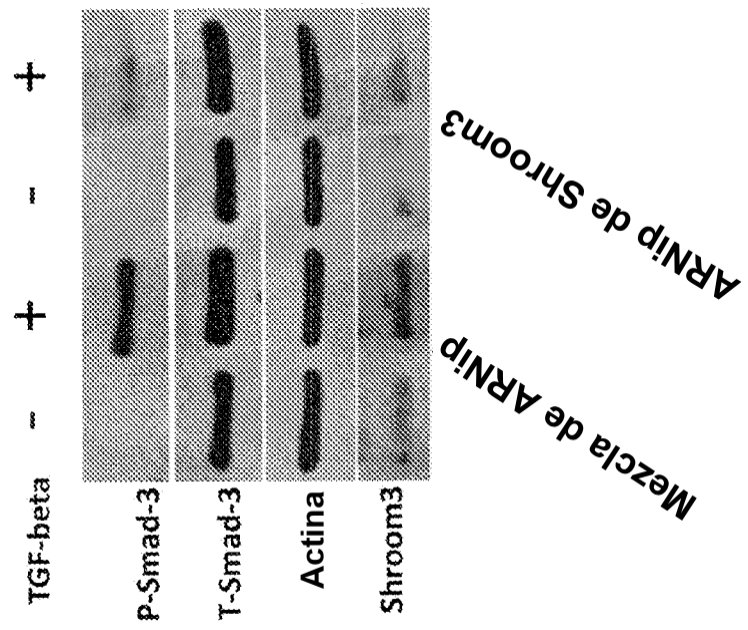


Fig. 15A

Fig. 15B



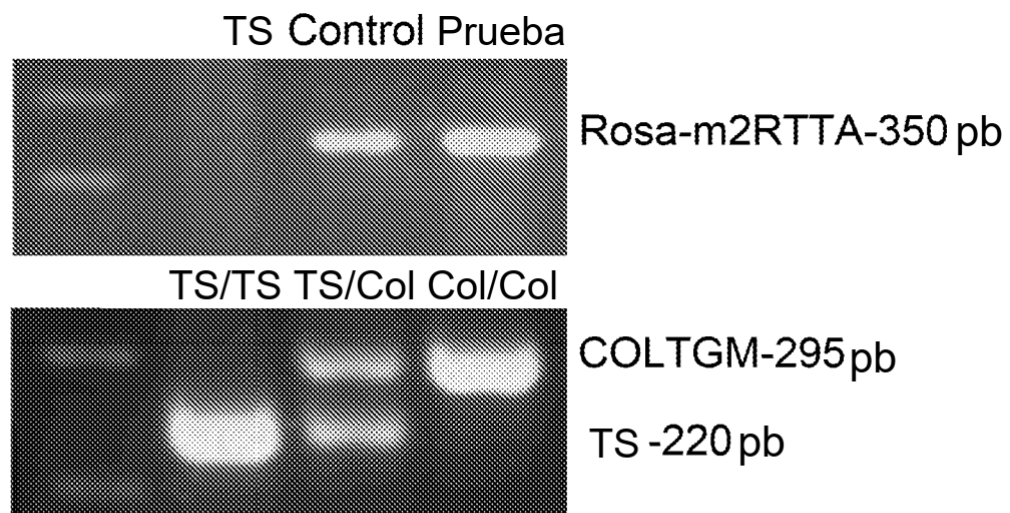


FIG. 16A

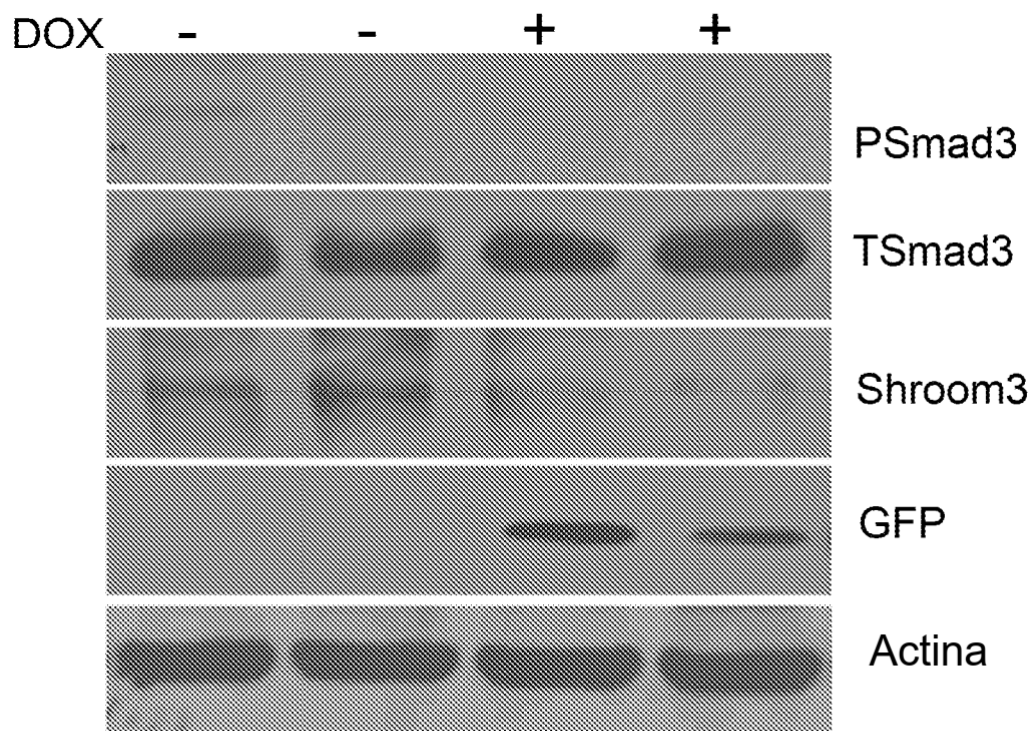
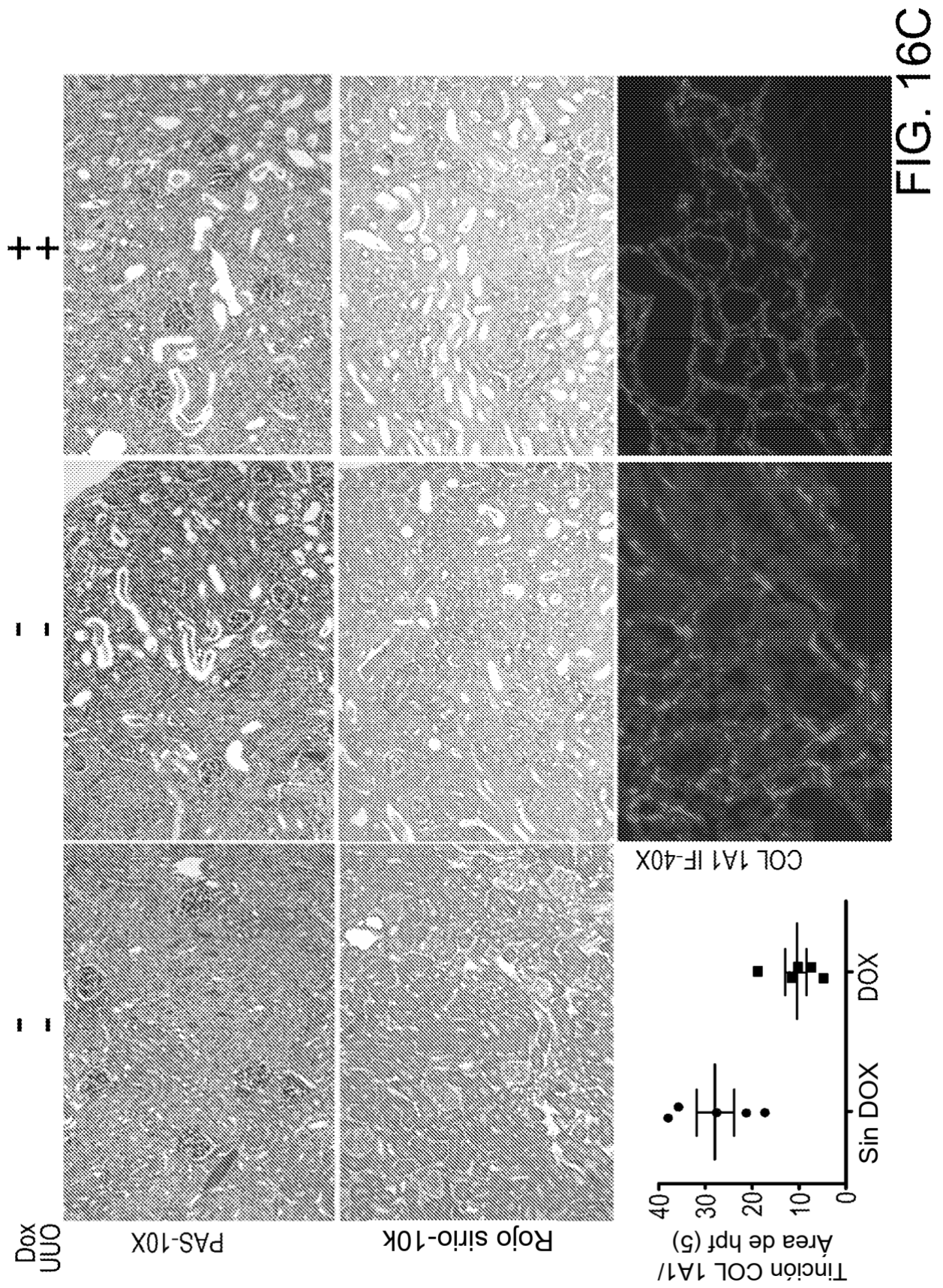


FIG. 16B



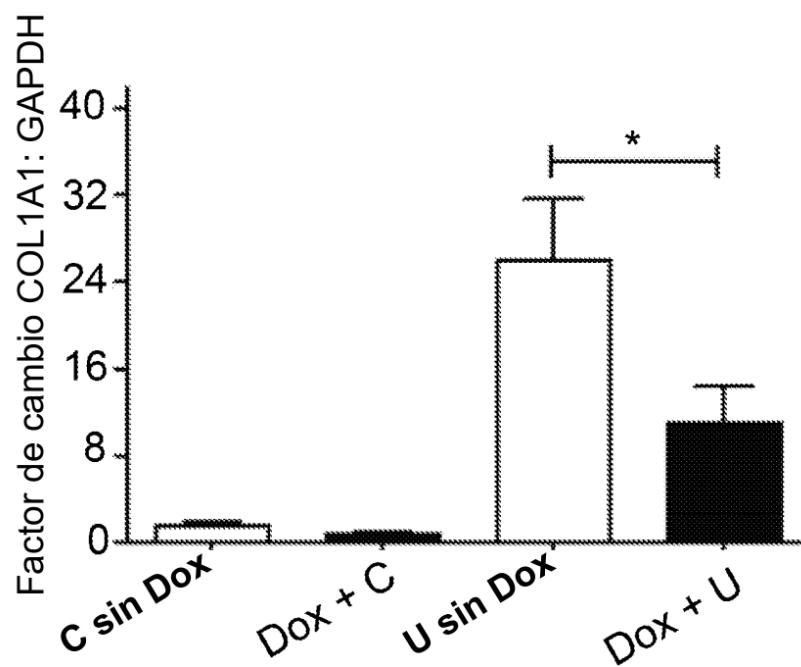
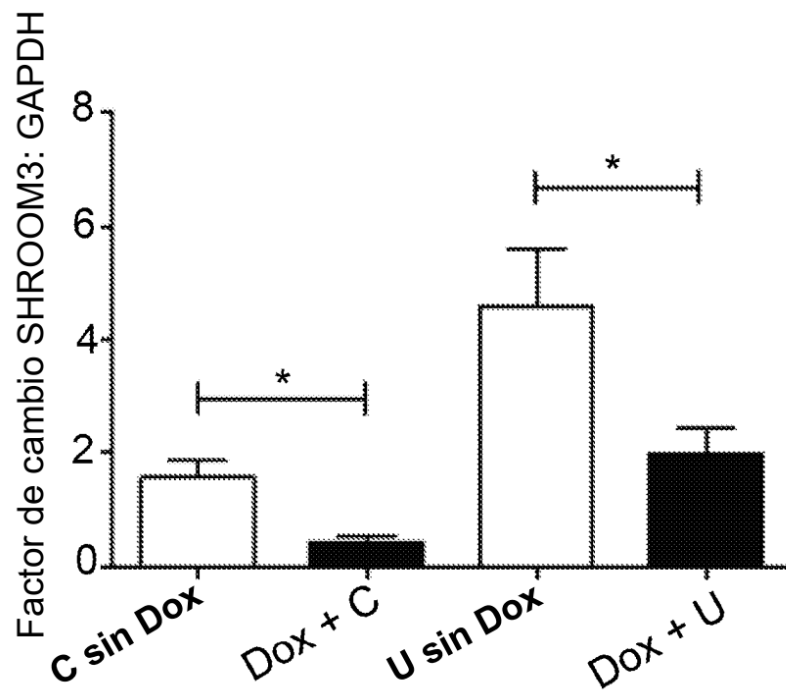


FIG. 16D