



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 324 751**

⑫ Número de solicitud: 200700073

⑤① Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **04.01.2007**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2009**

⑫④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
13.08.2009

⑦① Solicitante/s: **INSTITUT D'INVESTIGACIONS
BIOMÈDIQUES AUGUST PI I SUNYER (IDIBAPS)
c/ Vilarroel, 170
08036 Barcelona, ES
CENTRE DE REGULACIÓ GENÒMICA**

⑦② Inventor/es: **Sánchez Fueyo, Alberto;
Martínez Llordella, Marc;
Puig Pey, Isabel;
Rimola Castellà, Antoni;
Lozano Salvatella, Juan José y
Sumoy Van Dyck, Lauro**

⑦④ Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

⑤④ Título: **Métodos y kits para diagnosticar y/o pronosticar el estado de tolerancia en el trasplante de hígado.**

⑤⑦ Resumen:

Métodos y kits para diagnosticar y/o pronosticar el estado de tolerancia en el trasplante de hígado.

La supervivencia a largo plazo de los injertos trasplantados depende de manera crítica de la administración continuada de fármacos inmunosupresores para prevenir el rechazo del injerto. Estos fármacos son muy efectivos para prevenir el rechazo, pero también son responsables de efectos secundarios graves. Los inventores han seleccionado un grupo de genes cuya expresión permite caracterizar el estado de tolerancia en el trasplante hepático en humanos. Basándose en el perfil de expresión de este grupo de genes, los inventores proporcionan un método no invasivo para diagnosticar y/o pronosticar el estado de tolerancia en el trasplante hepático en humanos, así como kits para llevarlo a cabo. Estos kits son más sencillos y baratos que otros basados en el análisis de un gran número de genes, tales como los microarrays comerciales que contienen miles de sondas.

ES 2 324 751 A1

DESCRIPCIÓN

Métodos y kits para diagnosticar y/o pronosticar el estado de tolerancia en el trasplante de hígado.

- 5 Esta invención se refiere al campo de la medicina humana y específicamente al diagnóstico y/o pronóstico del estado de tolerancia en un trasplante particular.

Estado de la técnica anterior

- 10 La supervivencia a largo plazo de los injertos trasplantados depende de manera crítica de la administración continuada de fármacos inmunosupresores para prevenir el rechazo del injerto. Estos fármacos son muy efectivos para prevenir el rechazo, pero también son responsables de efectos secundarios graves, tales como nefrotoxicidad, mayor riesgo de infecciones oportunistas y tumores, y complicaciones metabólicas como diabetes, hiperlipidemia, e hiper-
- 15 definida como aquel estado en el cual el injerto, mantiene una función normal en ausencia de inmunosupresión crónica, es uno de los objetivos fundamentales de la investigación en inmunología del trasplante. La inducción de tolerancia es posible en un gran número de modelos experimentales de trasplante en roedores. La aplicación de estos tratamientos experimentales en la clínica ha sido sin embargo en gran parte un fracaso. El trasplante hepático es la única situación clínica en la cual la tolerancia se produce de manera espontánea en una proporción substancial de los pacientes. De
- 20 hecho, la retirada completa del tratamiento inmunosupresor puede alcanzarse en hasta un 21% de los pacientes (cf. J. Lerut *et al.*, "An appraisal of tolerance in liver transplantation", *American Journal of Transplantation* 2006, vol. 6, pp. 1774-80). Desgraciadamente, carecemos en la actualidad de medios para identificar a estos pacientes tolerantes antes de suprimir el tratamiento inmunosupresor. Por esta razón, la retirada completa de los fármacos inmunosupresores raramente se intenta en el trasplante de hígado, y esto hace que muchos pacientes continúan recibiendo innecesariamente
- 25 tratamiento inmunosupresor, con los problemas económicos y de salud pública que esto comporta.

- Una de las razones por las cuales la aplicación clínica en humanos de los tratamientos experimentales inductores de tolerancia no ha sido exitosa tiene que ver con la falta de una herramienta que permita diagnosticar de manera no invasiva la tolerancia en receptores humanos de trasplante. Publicaciones recientes enfatizan la necesidad imperiosa
- 30 de contar con esta herramienta (p.ej. N. Najafian *et al.*, "How can we measure immunologic tolerance in humans?", *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006, vol. 17, pp. 2652-63; K. A. Newell *et al.*, "Tolerance assays: measuring the unknown", *Transplantation* 2006, vol. 81, pp. 1503-9).

- Para identificar la tolerancia en el trasplante, fundamentalmente de riñón e hígado, se han utilizado o bien ensayos
- 35 funcionales antígeno específicos, o bien ensayos antígeno no-específicos. En los ensayos funcionales se prueban linfocitos T del receptor con antígenos del donante, ya sea *in vitro* o *in vivo* (cf. J. Cai *et al.*, "Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8+ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance", *J. Exp. Med.* 2004, vol. 199, pp. 1017-23; E. Jankowska-Gan E *et al.*, "Human liver allograft acceptance and the tolerance assay", *Hum. Immunol.* 2002, vol. 63, pp. 862-70; M. Hernández-Fuentes *et al.*, "Indices of tolerance: Interim report", abstract
- 40 #999, World Transplant Congress 2006,). Estos ensayos son muy valiosos desde un punto de vista mecanístico, ya que son los únicos tests capaces de desentrañar los mecanismos responsables de la especificidad del estado de tolerancia. Desgraciadamente, estos ensayos son también difíciles de llevar a cabo, muy variables de laboratorio a laboratorio (difíciles de estandarizar), y requieren la disponibilidad de células del donante que hayan sido criopreservadas de manera cuidadosa. Por estas razones, los tests funcionales no son la metodología óptima para un uso clínico a gran escala, y en
- 45 la actualidad se realizan únicamente en laboratorios seleccionados, muy especializados, y para fines fundamentalmente de investigación.

- Los tests antígeno no-específicos de inmunomonitorización representan un grupo heterogéneo de metodologías encaminadas a caracterizar fenotípicamente el sistema inmune del receptor, sin utilizar para ello antígenos del donante.
- 50 Entre estos tests, el estudio de los patrones de distribución de la longitud del segmento CDR3 del receptor de células T (TcLand) y el inmunofenotipaje de las células de sangre periférica por citometría de flujo, han sido utilizados para identificar biomarcadores característicos de la tolerancia en humanos. La técnica de TcLand ha sido empleada para discriminar entre receptores de un trasplante renal tolerantes y receptores con rechazo crónico, utilizando muestras de sangre periférica (cf. S. Brouard *et al.*, "Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients
- 55 display strongly altered blood T-cell clonal regulation", *Am. J. Transplant.* 2005, vol. 5, pp. 330-40). Esta técnica, sin embargo, es cara, está disponible en la actualidad en un único laboratorio (Inserm 643 and TcLand Biotech en Nantes, Francia), y no ha sido nunca validada en el trasplante hepático. El inmunofenotipaje de células de sangre periférica mediante citometría de flujo ha sido empleado con muestras de pacientes tolerantes trasplantados de hígado o riñón. Los inventores conocen dos estudios sobre esta metodología. En el primero de ellos, de la Universidad de Pittsburgh en EEUU (cf. G.V. Mazariegos *et al.*, "Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal
- 60 of immunosuppression in liver transplant patients", *Am. J. Transplant.* 2003, vol. 3, pp. 689-96), se dice que el cociente entre los subtipos de células dendríticas pDC y mDC podría discriminar entre receptores pediátricos de un trasplante hepático tolerantes y no tolerantes. En el segundo estudio, de Kyoto (cf. Y. Li *et al.*, "Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation", *Am. J. Transplant.* 2004,
- 65 vol. 4, pp. 2118-25), se dice que un incremento en el cociente entre las células T gammadelta en sangre periférica, delta-1 y delta-2, es más prevalente en los receptores hepáticos tolerantes que en los no tolerantes. Sin embargo, ninguno de estos tests alcanza la precisión requerida para una aplicación clínica a gran escala.

Aunque el uso crónico de los fármacos inmunosupresores es en la actualidad el único medio de asegurar la supervivencia a largo plazo de los aloinjertos trasplantados, estos fármacos son caros y se asocian a la aparición de efectos secundarios graves (nefrotoxicidad, desarrollo de tumores e infecciones, diabetes, complicaciones cardiovasculares, etc.) que dan lugar a una morbilidad y mortalidad importantes. Por ello, cualquier estrategia capaz de reducir significativamente el uso de los fármacos inmunosupresores en los trasplantes puede tener un impacto notable en la salud y la calidad de vida de los pacientes trasplantados.

Descripción de la invención

Los inventores han seleccionado un grupo de genes cuya expresión caracteriza el estado de tolerancia en el trasplante hepático en humanos. Basándose en el perfil de expresión de este grupo de genes, los inventores proporcionan aquí un método no-invasivo para diagnosticar y/o pronosticar el estado de tolerancia en el trasplante hepático en humanos.

En este contexto, es pertinente mencionar que el estudio del perfil de expresión genética se ha utilizado previamente para diagnosticar el rechazo tanto en el trasplante de riñón como de corazón, y también para la detección de la tolerancia en el trasplante renal (cf. Miqueu M, *et al.*, “Discrimination of kidney transplant recipients presenting operational tolerance from chronic rejection”, abstract #998, World Transplant Congress 2006). En lo que hace referencia al trasplante hepático, se ha publicado un estudio sobre los perfiles de expresión genética de los linfocitos obtenidos de receptores tolerantes en un modelo de trasplante hepático en ratas (cf. Fujino *et al.*, “Differences in lymphocyte gene expression between tolerant and syngeneic liver grafted rats”, *Liver Transpl.* 2004, vol. 10, pp. 379-91). Sin embargo, las tecnologías de expresión genética para detectar tolerancia, sin embargo, no se han utilizado todavía en el trasplante hepático en humanos.

La invención proporciona un método para diagnosticar y/o pronosticar el estado de tolerancia en el trasplante hepático en un paciente humano, que comprende los siguientes pasos: (a) obtención de una muestra biológica del paciente; y (b) medición de los niveles de expresión en la muestra de un grupo de genes que comprenden los veintidós siguientes: receptor III del factor de transformación del crecimiento beta (TGFB β 3, NCBI Gene ID 7049), miembro 1 de la subfamilia B de los receptores tipo lectina de las células *killer* (KLRB1, NCBI Gene ID 3820), homólogo 8 de la glicosilación de la asparagina (ALG8, NCBI Gene ID 79053), grupo G de la complementación de la anemia de Fanconi (FANCG, NCBI Gene ID 2189), proteína asociada *gem 7* (GEMIN7, NCBI Gene ID 79760), secuencia *natural killer* grupo 7 (NKG7, NCBI Gene ID 4818), homólogo B de RAD23 de *Saccharomyces cerevisiae* (RAD23B, NCBI Gene ID 5887), miembro 7 de la familia SLAM (SLAMF7, NCBI Gene ID 57823), inhibidor de la apoptosis 1 regulado por TP53 (TRIAP1, NCBI Gene ID 51499), isoforma beta de la fosfatasa 1B dependiente de magnesio (PPM1 B, NCBI Gene ID 5495), marco de lectura abierto 119 del cromosoma 10 (C10orf119, NCBI Gene ID 79892), locus delta del receptor de células T (TRD@, NCBI Gene ID 6964), miembro 1 de la familia A de proteínas nucleolares (NOLA1, NCBI Gene ID 54433), dominio 1 conteniendo DCN1 defectiva en cullin neddylation 1 de *Saccharomyces cerevisiae* (DCUNID1, NCBI Gene ID 54165), proteína 1 de unión a la distrobrevina (DTNBP1, NCBI Gene ID 84062), subunidades alfa y beta de N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa (GNPTAB, NCBI Gene ID 79158), subunidad 26S no-ATPasa 14 del proteosoma (PSMD14, NCBI Gene ID 10213), subunidad zeta 1 del complejo proteico de coatómero (COPZ1, NCBI Gene ID 22818), proteína A10 de unión al calcio S100 (S100A10, NCBI Gene ID 6281), ataxina 10 (ATXN10, NCBI Gene ID 25814), factor 1 de unión a secuencia ARN rica en G (GRSF1, NCBI Gene ID 2926), y molécula CD244 receptor de células *natural killer* 2B4 (CD244, NCBI Gene ID 51744); donde niveles de expresión de los genes por encima o por debajo de valores dintel pre-determinados son indicativos del estado de tolerancia en el trasplante hepático. Las referencias de los genes se han hecho incluyendo el nombre, símbolo, y la identificación (*Gene ID*) de la NCBI.

Tal y como aquí se usa aquí, el término “estado de tolerancia” significa la aceptación de un hígado trasplantado que mantiene una función normal en ausencia de tratamiento inmunosupresor continuado. En lo que respecta a la presente invención, los términos “tolerancia” y “tolerancia operacional” se consideran equivalentes. El término “diagnóstico” se refiere a la identificación de pacientes tolerantes de entre los receptores de un trasplante hepático que están recibiendo tratamiento inmunosupresor de mantenimiento. El término “pronóstico” hace referencia a la capacidad de predecir que la reducción/retirada de la medicación inmunosupresora en receptores de un trasplante hepático se lleve a cabo con éxito, antes de que se intente modificar la medicación.

En una realización de la presente invención los niveles de expresión de los genes se encuentran por encima de valores dintel pre-determinados obtenidos a partir de una muestra control. En una realización particular, la muestra control se obtiene de un receptor de trasplante hepático no-tolerante que requiere tratamiento inmunosupresor continuado, que puede llamarse “paciente dependiente de inmunosupresión” (ID).

Los genes diferentemente expresados pueden estar tanto sobre o infra-regulados en una situación determinada. “Sobre-regulación” e “infra-regulación” son términos relativos e indican que la diferencia en la expresión genética que se puede detectar por encima de la contribución del ruido del sistema de medición se establece en referencia a un valor de expresión genética basal. En el caso presente, la expresión basal es la expresión genética medida en la muestra control. Los genes de interés en el estado de tolerancia se hayan sobre-regulados en relación con los niveles basales obtenidos utilizando el mismo método de medición.

La presente invención proporciona medios para usar la cuantificación de la expresión genética para diagnosticar el estado de tolerancia en pacientes receptores de un trasplante hepático antes de que la retirada o reducción del tratamien-

to inmunosupresor haya sido efectuada. La principal aplicación de esto es el diagnóstico de los receptores tolerantes de un trasplante hepático de entre todos los pacientes que están recibiendo tratamiento inmunosupresor crónico. Por consiguiente, esto permite la reducción en la dosis o la retirada de los fármacos inmunosupresores en aquellos pacientes identificados como tolerantes sin que estos desarrollen rechazo. Esto puede tener como resultado una reducción

5 substancial de la morbilidad/mortalidad asociadas a los efectos secundarios de los fármacos inmunosupresores. Esto también implica una disminución significativa en los costes financieros del tratamiento que se administra después de un trasplante hepático.

La medición de los niveles de expresión de los genes en la muestra biológica puede efectuarse tanto utilizando los

10 productos de la transcripción de estos genes (ARN mensajeros), como los productos de la traducción (las proteínas).

En una realización particular, la medición de los niveles de expresión de los genes se lleva a cabo utilizando un *microarray* o un chip genético que comprende sondas de ácidos nucleicos. Dichas sondas comprenden secuencias que se hibridan de manera específica a los productos de la transcripción del grupo de genes definido anteriormente. Como

15 mínimo es preciso que en el *microarray* o en el chip genético exista al menos una sonda para cada uno de los productos de transcripción para detectar todos los genes definidos antes, pero es posible que exista más de una sonda para el mismo producto de transcripción.

El término “se hibridan de manera específica a” se refiere a la unión, formación de un dúplex o hibridación que se lleva a cabo de manera substancial entre una molécula y una o varias secuencias particulares de nucleótidos en condiciones estrictas, cuando esta secuencia se encuentra en una mezcla compleja (por ejemplo ADN o ARN celular total). “Hibridación” se refiere al proceso por el cual dos polinucleótidos de cadena única se unen de manera no covalente para formar un polinucleótido de doble cadena estable.

20

La tecnología de los *microarrays* es capaz de medir los niveles de ARNm de un gran número de genes de manera simultánea, y constituye por tanto una herramienta muy potente para identificar perfiles de expresión genética característicos de enfermedades o estados específicos. En la actualidad se utilizan fundamentalmente dos tipos de tecnologías de *microarrays*. La primera son los *microarrays* de ADN complementario (ADNc) y la segunda los *microarrays* de oligonucleótidos. Aunque existen diferencias en la construcción de estos chips, la información que proporcionan y el análisis de los datos es muy similar. Habitualmente la muestra de ácidos nucleicos se prepara de una fuente adecuada y se marca con un marcador específico, como p.ej. una molécula fluorescente). La muestra se incuba con el *microarray* en unas condiciones específicas que favorezcan la hibridación. Los *microarrays* son entonces lavados o procesados de alguna otra manera para eliminar los ácidos nucleicos no hibridados. A continuación la hibridación es evaluada mediante la detección de la distribución del marcador en el chip. La distribución del marcador puede detectarse escaneando los *microarrays* para determinar la distribución de la intensidad de fluorescencia. Típicamente la hibridación de cada sonda se estima por la intensidad de los pixels correspondientes. La intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de ADNc y, por tanto, de ARNm, expresado en la muestra. El análisis de los niveles de expresión diferencial se efectúa comparando estas intensidades para la muestra en estudio y la muestra control. El cociente entre las intensidades indica la expresión relativa (“fold-change”) entre la muestra en estudio y la muestra control.

25

30

35

40

En una realización particular de la invención, el *microarray* es un *microarray* de ADNc. En este formato las sondas de ADNc (~500-5000 bases de longitud) son inmovilizadas sobre una superficie sólida, por ejemplo cristal, utilizando un robot y las muestras en estudio y control son hibridadas bien mezcladas o por separado. Este método tradicionalmente conocido como *microarray* de ADN, fue desarrollado originariamente en la Universidad de Stanford.

45

En otra realización particular, el *microarray* es un *microarray* de oligonucleótidos. En este formato los oligonucleótidos (~20-80-mer) o las sondas de ácido péptido nucleico (PNA, de “peptide nucleic acid”) son sintetizadas *in situ* (en el propio chip) o bien sintetizadas de manera convencional y posteriormente inmovilizadas en el chip. La muestra de ácidos nucleicos marcados es hibridada con el *microarray* tras lo cual se calcula la abundancia e identidad de las secuencias complementarias. Este método históricamente conocido como chip de ADN, fue desarrollado por Affymetrix, Inc., que los fabrica utilizando técnicas de fotolitografía y los comercializa bajo la marca registrada GeneChipe. Muchas compañías fabrican en la actualidad *microarrays* de oligonucleótidos utilizando otras técnicas alternativas de síntesis *in situ* o de deposición.

50

El *microarray* puede confeccionarse bajo un gran número de formatos, por ejemplo, como librerías de moléculas solubles, y como librerías de compuestos unidos a partículas de resina o a chips de sílice, de vidrio o a cualquier otro soporte sólido. Existe por tanto un gran número de configuraciones, soportes y métodos de producción que son bien conocidos por los expertos en la materia. Las sondas pueden ser confeccionadas según cualquiera de las metodologías conocidas, ya sea sintéticamente o mediante la producción en un hospedador biológico. Los métodos sintéticos incluyen, pero no están limitados a, la síntesis de oligonucleótidos, sondas de ARN (“riboprobes”) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las sondas pueden ser marcadas con un marcador que pueda ser detectado utilizando métodos conocidos. Métodos para el marcaje de las sondas incluyen *random priming*, *end labeling*, PCR y *nick translation*.

55

60

En una realización particular, el *microarray* o chip genético comprende además una o más sondas internas control que se utilizan como sondas de normalización, controles del nivel de expresión y controles de hibridación cruzada (controles *mismatch*). Las sondas de normalización se utilizan para controlar aquellos factores que pueden impedir que la hibridación sea perfecta, y por tanto que se produzcan diferencias entre distintos *microarrays*, por ejemplo, debido a diferencias en las condiciones de hibridación, intensidad del marcaje, eficiencia de la “lectura”, etc. Los controles

65

de nivel de expresión son sondas que se hibridan específicamente con genes expresados de manera constitutiva en la muestra analizada (genes “housekeeping”). Los controles *mismatch* son sondas de oligonucleótidos idénticas a sus correspondientes sondas test o control excepto en una o unas pocas bases. Los controles *mismatch* permiten descartar la hibridación no específica o hibridación cruzada, es decir, aquella por la cual una sonda se une a un ácido nucleico diferente de aquél frente al cual es específica (falsos positivos).

En otras realizaciones de la invención, la medición de los niveles de expresión de los genes se lleva a cabo utilizando PCR transcripción reversa (RT-PCR), RT-PCR competitiva, RT-PCR en tiempo real, *differential display* RT-PCR, análisis de Northern Blot y otros tests relacionados. En una realización particular de la invención, la medición de los niveles de expresión de los genes se lleva a cabo utilizando transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a partir de ARN extraído de la muestra. En una realización más particular, la RT-PCR comprende uno o más reactivos que actúan como controles internos. Otra opción es llevar a cabo estas técnicas de cuantificación de la expresión genética utilizando reacciones PCR para amplificar ADNc o ARNc producido a partir de ARNm y analizarlos utilizando *microarrays*.

En otras realizaciones, la medición de los niveles de expresión de los genes se lleva a cabo midiendo las proteínas codificadas por cada uno de los genes con anticuerpos específicos para ellas o con un chip de proteínas. Un chip o *array* de proteínas puede construirse en diversos formatos, pero habitualmente consiste en un soporte sólido sobre el cual se inmovilizan enzimas, proteínas receptores, anticuerpos o moléculas pequeñas que permiten detectar las proteínas contenidas en la muestra en estudio. En otra realización, la medición de los niveles de expresión de los genes se lleva a cabo por HPLC. Los niveles de expresión pueden también detectarse analizando una característica del gen que afecta su actividad transcripcional, como por ejemplo amplificación de ADN, metilación, mutación o variación alélica. Estos métodos son bien conocidos por los expertos en la materia.

Otros aspectos de la invención son kits para llevar a cabo los ensayos descritos previamente. Ya que estos kits se basan en la selección de un grupo de genes que comprenden los que se han pormenorizado previamente, los kits son más sencillos y baratos que otros métodos basados en un gran número de genes, como por ejemplo los *microarrays* comerciales que contienen miles de genes. Así pues, un aspecto de la invención se refiere al uso de un kit para llevar a cabo el método definido anteriormente, que comprende (i) medios para medir los niveles de expresión de los genes seleccionados; y (ii) instrucciones para correlacionar los niveles de expresión por encima o por debajo de valores dintel pre-determinados indicativos del estado de tolerancia en el trasplante hepático. En una realización particular de la invención, los medios comprenden un *microarray* o un chip genético que comprende sondas de ácidos nucleicos, dichas sondas comprendiendo secuencias que se hibridan de manera específica a los productos de la transcripción del grupo de genes definido antes. Adicionalmente, el kit comprende además reactivos para llevar a cabo el análisis por *microarray*. En otra realización, los medios comprenden cebadores oligonucleótidos para llevar a cabo transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, dichos cebadores comprendiendo secuencias que se hibridan de manera específica al ADN complementario derivado de los productos de la transcripción del grupo de genes definido antes. Preferiblemente, cada uno de estos kits incluirá instrucciones así como los reactivos necesarios para llevar a cabo el tipo de ensayo descrito. Estos reactivos pueden ser *arrays* de ácidos nucleicos (p.ej. *microarrays* de oligonucleótidos o ADNc) configurados de manera que puedan detectar el perfil de expresión genética de la invención. También pueden consistir en reactivos para llevar a cabo la amplificación y detección de los ácidos nucleicos, incluyendo p.ej. transcriptasa inversa, cebadores para llevar a cabo la retrotranscripción, grupo de cebadores para la PCR correspondiente, ADN polimerasa termoestable como la Taq polimerasa, y reactivos apropiados para llevar a cabo la detección como pueden ser, entre otros, sondas fluorescentes o pigmentos que se unen al ADN de doble cadena como el bromuro de etidio o el SYBRgreen. Los kits basados en anticuerpos contendrán tampones, anticuerpos secundarios, enzimas de detección y su sustrato, por ejemplo “Horse Radish Peroxidase” o reactivos basados en biotina-avidina.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un *microarray* o un chip genético para llevar a cabo el método definido antes, que comprende un soporte sólido sobre el cual se han depositado sondas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias que se hibridan de manera específica a los productos de la transcripción del grupo de genes definido antes.

La práctica de la presente invención también puede requerir el uso de métodos biológicos convencionales y *software*. Los productos de *software* de la invención incluyen medios legibles por ordenador que contienen instrucciones ejecutables por ordenador para realizar los pasos lógicos del método de la invención. La presente invención puede también utilizar diversos *softwares* y programas informáticos diseñados para llevar a cabo una gran variedad de funciones, como por ejemplo el diseño de sondas, el procesamiento de datos, el análisis, y la manipulación de los aparatos necesario.

Finalmente, otro aspecto de la invención se refiere a un método para seleccionar o modificar un protocolo de tratamiento, ya sea antes o después del trasplante hepático, que comprende el uso del método para diagnosticar y/o pronosticar según se define anteriormente. Antes de que se lleve a cabo un trasplante hepático, la invención permite identificar a aquellos pacientes que acabarán desarrollando tolerancia, y que por tanto no necesitan pautas agresivas de inmunosupresión. Una vez el trasplante hepático ya ha sido realizado, la invención permite adecuar la medicación inmunosupresora al estado del paciente. Los cambios en el tratamiento del paciente podrán incluir la administración de fármacos adicionales, cambios en la dosis o frecuencia de las medicaciones, o retirada completa del tratamiento. Este análisis permite intervenciones o ajustes del tratamiento antes de que se produzcan cambios clínicamente detectables en el estado de los pacientes, o cuando los cambios clínicos resulten ser ambiguos.

Tal y como se utiliza aquí, “la muestra biológica del paciente” puede ser sangre no fraccionada, leucocitos, bilis o células procedentes de la bilis, y pueden ser también porciones de tejido hepático en forma de tejido fresco, secciones congeladas o secciones fijadas en formalina. Tal y como es evidente para alguien experto en la materia, las muestras biológicas serán procesadas por el método o procedimiento adecuados al tipo de tecnología analítica que vaya a llevarse a cabo a continuación. Los métodos para extraer ARN total o ARNm son bien conocidos. Además de muestras de ARN, las muestras utilizadas pueden incluir ADNc sintetizado a partir de ARNm o ARN total aislados a partir de una célula o tejido de interés. Estas muestras también pueden incluir ADN amplificado a partir del ADNc y ARN transcrito a partir de ADN amplificado.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción detallada de realizaciones particulares

Los inventores utilizaron la tecnología de los *microarrays* de oligonucleótidos en muestras de sangre obtenidas de receptores de trasplante hepático tolerantes y no-tolerantes, y determinaron que los pacientes hepáticos tolerantes exhiben en células de sangre periférica un perfil de expresión genética característico. Los inventores han utilizando diversas metodologías de clasificación para identificar un grupo de genes cuyos niveles de expresión pueden utilizarse para diagnosticar el estado de tolerancia con gran precisión.

Pacientes

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de una cohorte de 9 receptores adultos de un trasplante hepático tolerantes (TOL) (>1 año después de la retirada de la inmunosupresión). Para los estudios comparativos se obtuvieron también muestras de sangre de 11 receptores adultos de un trasplante hepático a los cuales en algún momento se intentó de manera infructuosa retirar la medicación inmunosupresora, lo cual condujo al desarrollo de rechazo agudo de injerto y por tanto a la reinstauración del tratamiento inmunosupresor (pacientes dependientes de inmunosupresión o ID). En los receptores ID las muestras de sangre fueron recolectadas al menos 2 años después de la resolución completa del episodio de rechazo agudo. También se obtuvieron muestras de sangre de un grupo de 10 individuos sanos de edades similares a las de los receptores hepáticos.

Experimentos con microarrays

Después de aislar las células mononucleares de sangre periférica empleando un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque layer (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), se extrajo el ARN total utilizando el reactivo Trizol (Life Technologies, Rockville, MD, EEUU), a partir del cual se generó ARNc que fue hibridado a los chips Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array que contienen sondas para 47000 ARNm (Affymetrix, Inc, Santa Clara, CA, EEUU). La base de datos completa comprendía medidas de expresión de 54675 genes para 9 muestras TOL y 11 muestras ID. Los archivos CEL resultantes fueron procesados, normalizados y sus valores de expresión tabulados utilizando el algoritmo gcrma contenido el paquete bioinformático *Bioconductor* (<http://www.bioconductor.org>). Para identificar los genes diferentemente expresados entre los receptores TOL y ID se analizaron inicialmente los datos procedentes de un subgrupo de muestras (9 TOL y 8 ID) utilizando una metodología Bayesiana para el análisis diferencial que se encuentra implementada en el programa BADGE (Bayesian Analysis of Differential Gene Expression, <http://www.genomethods.org/badge>). La base de datos completa fue a continuación re-analizada independientemente utilizando el programa Significance Analysis of Microarray (SAM; V.G. Tusher *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001 vol. 98, pp. 5116–21) para 500 permutaciones. SAM es un *software* para la detección de genes diferentemente expresados en *microarrays*. Su metodología de permutación mantiene la correlación inter-gen y da cuenta del problema de las comparaciones múltiples de manera automática. Para realizar el análisis se seleccionaron los parámetros con una predicción de un 5% de falsos positivos. Finalmente, se utilizó el programa Prediction Analysis of Microarray (PAM; R. Tibshirani *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, pp. 6567-72) para identificar el grupo más reducido de genes con capacidad discriminativa para distinguir las muestras TOL de las ID. El programa PAM es muy potente a la hora de seleccionar un pequeño grupo de genes con alto valor predictivo. Se utilizaron parámetros de validación cruzada con un dintel de 2.9 para obtener una lista de genes con un porcentaje de error global del 5%.

Experimentos de validación por PCR TaqMan en tiempo real y citometría de flujo

Para validar técnicamente los resultados del array se seleccionaron los siguientes genes, a partir de la lista de 628 genes obtenida con el programa BADGE (CD94, IL1, IL23, TNF α , ICAM1, BAX, BCL-2, CD103, FASL, FOXP3, GTR, GZMB, TIM1, TIM3, HO1, IFN γ , IL10, IL15, TGF β 1, A20, PRF1, IL6), y se cuantificó su expresión utilizando PCR en tiempo real con un aparato ABI 7900 Sequence Detector System y sondas y cebadores de Assays-on-Demand primer/probe sets (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Para estos estudios el ARN total fue tratado con una enzima ADNasa (Ambion, Austin, TX, EEUU), y se llevó a cabo la transcripción reversa utilizando la enzima Multiscribed Reverse Transcriptase (PE Applied Biosystems). Para cuantificar los niveles de ARNm, la expresión de los genes diana descritos fue normalizada al gen *housekeeping* 18S, y los resultados fueron tabulados como expresión relativa (*fold change*) entre el ADNc de las muestras en estudio y una muestra calibrador. Por otra parte, se llevaron

a cabo estudios de inmunofenotipaje utilizando los siguientes anticuerpos: CD3, CD4, CD8, CD19, CD11 c, CD14, CD20, CD28, CD45RA, CD62L, CD123, HLA-DR, $\alpha\beta$ -TCR, $\gamma\delta$ -TCR, V δ 1-TCR (de BD Biosciences, Mountain View, CA, USA), V δ 2-TCR, V α 24-TCR (de Beckman Coulter, Fullerton, CA, EEUU) y Foxp3 (Treg staining kit, eBioscience, San Diego, CA, EEUU). Para llevar a cabo las tinciones, alícuotas de 100 μ l de sangre anticoagulada con EDTA fueron incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos con una combinación de los anticuerpos apropiados. Las muestras teñidas fueron analizadas utilizando un citómetro FACScalibur con el programa Cellquest Pro software (BD Biosciences).

La cuantificación de la expresión genética global permite discriminar entre receptores TOL y ID

En el primer análisis, en el que únicamente se utilizó los datos de un subgrupo de muestras el programa BADGE seleccionó aquellos genes con más del 99.5% y menos del 0.5% de probabilidad de estar más expresados en los receptores TOL que en los ID. Esto dio como resultado un total de 462 genes sobre-expresados y 166 genes infra-expresados. De entre estos 628 genes, los niveles de expresión de un subgrupo seleccionado (CD94, IL1, IL23, TNF α , ICAM1, BAX, BCL-2, CD103, FASL, FOXP3, GITR, GZMB, TIM1, TIM3, HO1, IFN γ , IL10, IL15, TGF β 1, A20, PRF1, IL6) fueron cuantificados por PCR en tiempo real para validar desde el punto de vista técnico la precisión de los resultados del *microarray*. En todos los casos las tendencias observadas por PCR fueron similares a los patrones de expresión genética identificados por los *microarrays*. Estos experimentos confirmatorios por PCR indican que es posible utilizar la PCR en tiempo real para cuantificar de manera directa los niveles de expresión de un grupo seleccionado de genes sin necesidad de llevar a cabo estudios utilizando *microarrays* de todo el genoma.

Para evaluar la significación estadística de los genes diferentemente expresados en la base de datos completa se utilizó entonces el programa SAM utilizando los parámetros correspondientes a una predicción de un 5% de falsos positivos. Esto dio como resultado una lista de 68 genes capaces de discriminar entre muestras TOL y ID con una precisión del 95%. De manera independiente se utilizó el programa PAM en la misma base de datos completa para encontrar la lista con el mínimo número de genes capaz de clasificar las muestras en TOL o ID de manera precisa. El resultado de este análisis fue una lista de 34 genes que cumplían el criterio del 5% de error global. De entre los 68 genes identificados por SAM, 22 fueron seleccionados también por PAM, indicando que 44 de los 68 genes identificados por SAM no eran imprescindibles para una correcta clasificación. Experimentos de validación computacional adicionales utilizando la técnica de la validación cruzada revelaron que la lista consensuada de 22 genes podía clasificar las muestras en las categorías TOL o ID con un error global del 5%. La tabla que se muestra a continuación (Tabla 1) incluye la lista de 22 genes que constituye el mínimo número de genes capaz de discriminar entre muestras TOL y ID.

Una validación adicional de los resultados obtenidos por *microarrays* se obtuvo a partir de los experimentos por citometría de flujo, en los cuales de entre todas las células mononucleares de sangre periférica únicamente el número de linfocitos T gammadelta (que expresan el gen TRD@) fue estadísticamente diferente entre receptores TOL y ID.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Gene ID	Identificación sonda (Affymetrix)	Nombre del gen	Símbolo del gen
7049	240188_at	receptor III del factor de transformación del crecimiento beta (betaglicano)	TGFBR3
3820	214470_at	miembro 1 de la subfamilia B de los receptores tipo lectina de las células <u>killer</u>	KLRB1
79053	203545_at	homólogo 8 de la glicosilación de la asparagina	ALG8
2189	203564_at	grupo G de la complementación de la anemia de Fanconi	FANCG
79760	1555751_a_at	proteína asociada <u>gem</u> 7	GEMIN7
4818	213915_at	secuencia <u>natural killer</u> grupo 7	NKG7
5887	214422_at	homólogo B de RAD23 de <u>S. cerevisiae</u>	RAD23B
57823	219159_s_at	miembro 7 de la familia SLAM	SLAMF7
51499	218403_at	inhibidor de la apoptosis 1 regulado por TP53	TRIAP1
5495	209296_at	isoforma beta de la fosfatasa 1B dependiente de magnesio	PPM1B
79892	217905_at	marco de lectura abierto 119 del cromosoma 10	C10orf119
6964	217143_s_at	locus delta del receptor de células T	TRD@
54433	219110_at	miembro 1 de la familia A de proteínas nucleolares	NOLA1
54165	222679_s_at	dominio 1 conteniendo DCN1 defectiva en cullin neddylation 1 de <u>S. cerevisiae</u>	DCUN1D1
84062	223763_at	proteína 1 de unión a la distrobrevina	DTNBP1
79158	212959_s_at	subunidades alfa y beta de N- acetilglucosamina-1-fosfato transferasa	GNPTAB
10213	212296_at	subunidad 26S no-ATPasa 14 del proteosoma	PSMD14
22818	222386_s_at	subunidad zeta 1 del complejo proteico de coatómero	COPZ1
6281	238909_at	proteína A10 de unión al calcio S100 (<i>annexin II ligand, calpactin I, light</i>)	S100A10

ES 2 324 751 A1

<i>polypeptide)</i>			
25814	208833_s_at	ataxina 10	ATXN10
2926	201520_s_at	factor 1 de unión a secuencia ARN rica en G	GRSF1
51744	220307_at	molécula CD244 receptor de células <u>natural killer</u> 2B4	CD244

REIVINDICACIONES

1. Método para diagnosticar y/o pronosticar el estado de tolerancia en trasplante hepático en un paciente humano,
5 que comprende los siguientes pasos:

- a) obtención de una muestra biológica del paciente; y
- b) medición de los niveles de expresión en la muestra de un grupo de genes que comprende los veintidós
10 siguientes: receptor III del factor de transformación del crecimiento beta (TGFB3), miembro 1 de la sub-
familia B de los receptores tipo lectina de las células killer (KLRB1), homólogo 8 de la glicosilación de la
asparagina (ALG8), grupo G de la complementación de la anemia de Fanconi (FANCG), proteína asociada
gem 7 (GEMIN7), secuencia natural killer grupo 7 (NKG7), homólogo B de RAD23 de *Saccharomyces*
15 *cerevisiae* (RAD23B), miembro 7 de la familia SLAM (SLAM F7), inhibidor de la apoptosis 1 regula-
do por TP53 (TRIAP1), isoforma beta de la fosfatasa 1B dependiente de magnesio (PPM1B), marco de
lectura abierto 119 del cromosoma 10 (C10orf119), locus delta del receptor de células T (TRD@), miem-
bro 1 de la familia A de proteínas nucleolares (NOLA1), dominio 1 conteniendo DCN1 defectiva en cullin
neddylatión 1 de *Saccharomyces cerevisiae* (DCUN1D1), proteína 1 de unión a la distrobrevina (DTNBP1),
20 subunidades alfa y beta de N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa (GNPTAB), subunidad 26S no-ATPa-
sa 14 del proteosoma (PSMD14), subunidad zeta 1 del complejo proteico de coatómero (COPZ1), proteína
A10 de unión al calcio S100 (S100A10), ataxina 10 (ATXN10), factor 1 de unión a secuencia ARN rica
en G (GRSF1) y molécula CD244 receptor de células natural killer 2B4 (CD244); donde los correspon-
dientes niveles de expresión de los genes por encima o por debajo de valores umbral pre-determinados son
25 indicativos del estado de tolerancia en el trasplante hepático.

2. Método, según la reivindicación 1, donde los niveles de expresión de los genes se encuentran por encima de un
valor umbral pre-determinado obtenido a partir de una muestra control.

3. Método, según la reivindicación 2, donde la muestra control se obtiene de un receptor de trasplante hepático no
30 tolerante que requiere tratamiento inmunosupresor continuado.

4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la medición de los niveles de expresión de los genes
se lleva a cabo utilizando un microarray o un chip genético que comprende sondas de ácidos nucleicos, dichas sondas
comprendiendo secuencias que se hibridan de manera específica a los productos de la transcripción del correspondiente
35 grupo de genes.

5. Método, según la reivindicación 4, donde el microarray es un microarray de ADNc.

6. Método, según la reivindicación 4, donde el microarray es un microarray de oligonucleótidos.
40

7. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la medición de los niveles de expresión de los
genes se lleva a cabo utilizando transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a partir de
ARN extraído de la muestra.

8. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la medición de los niveles de expresión de los genes
se lleva a cabo midiendo las proteínas codificadas por los correspondientes genes.
45

9. Método, según la reivindicación 8, donde las proteínas se detectan mediante anticuerpos específicos para las
proteínas.
50

10. Método, según la reivindicación 8, donde las proteínas se detectan mediante un chip de proteínas.

11. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la medición de los niveles de expresión de los
genes se lleva a cabo por HPLC.
55

12. Uso de un kit para llevar a cabo el método de las reivindicaciones 1-11, que comprende (i) medios para medir
los niveles de expresión del correspondiente grupo de genes; y (ii) instrucciones para correlacionar los niveles de
expresión por encima o por debajo de valores umbral pre-determinados indicativos del estado de tolerancia en el
trasplante hepático.
60

13. Uso del kit, según la reivindicación 12, donde los medios comprenden un microarray o un chip genético que
comprende sondas de ácidos nucleicos, dichas sondas comprendiendo secuencias que se hibridan de manera específica
a los productos de la transcripción del correspondiente grupo de genes.

14. Uso del kit, según la reivindicación 13, que comprende además reactivos para llevar a cabo el análisis por
microarray.
65

ES 2 324 751 A1

15. Uso del kit, según la reivindicación 12, donde los medios comprenden cebadores oligonucleótidos para llevar a cabo la transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, dichos cebadores comprendiendo secuencias que se hibridan de manera específica al ADN complementario derivado de los productos de la transcripción del correspondiente grupo de genes.

5

16. Uso de un microarray o un chip genético para llevar a cabo el método definido en las reivindicaciones 2-5, que comprende un soporte sólido sobre el cual se han depositado sondas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias que se hibridan de manera específica a los productos de la transcripción del correspondiente grupo de genes.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 324 751

⑫ Nº de solicitud: 200700073

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 04.01.2007

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WEINTRAUB L.A., SARWAL M.M., "Microarrays: a monitoring tool for transplant patients?" TRANSPLANT INTERNATIONAL (octubre 2006), vol. 19; Nº 10; páginas 775-778; ISSN 0934-0874; DOI: 10.1111/j.1432-2277.2006.00349.x; página 782, columna 2, párrafo 2 - página 783, columna 2, párrafo 1.	1-16
X	TANNAPFEL A. et al., "Analysis of liver allograft rejection related genes using cDNA-microarrays in liver allograft specimen" TRANSPLANTATION PROCEEDINGS (1 noviembre 2001) vol. 33; Nº 7-8; páginas 3283-3284; ISSN 0041-1345; todo el documento.	1-16
X	COSENZA C.A. et al., "Liver graft cytokine gene expression in human liver allografts" LIVER TRANSPLANTATION AND SURGERY (1 enero 1995) vol. 1; Nº 1; páginas 16-22; ISSN 1074-3022; resumen.	1-16
X	CORDOBA S.P. et al., "Gene array analysis of a rat model of liver transplant tolerance identifies increased complement C3 and the STAT-1/IRF-1 pathway during tolerance induction" LIVER TRANSPLANTATION (abril 2006) vol. 12; Nº 4; páginas 636-643; ISSN 1527-6465; DOI: 10.1002/lt.20637; todo el documento.	1-16
X	FUJINO M. et al., "Differences in lymphocyte gene expression between tolerant and syngeneic liver grafted rats" LIVER TRANSPLANTATION (1 marzo 2004) vol. 10; Nº 3; páginas 379-391; ISSN 1527-6465; resumen.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

22.07.2009

Examinador

A. García Coca

Página

1/6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 324 751

⑫ Nº de solicitud: 200700073

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **04.01.2007**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **C12Q 1/68** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BERBERAT P.O. et al., "Differentially expressed genes in postperfusion biopsias predict early graft dysfunction alter liver transplantation" TRANSPLANTATION (15 septiembre 2006) vol. 82; N° 5; páginas 699-704; ISSN 0041-1337; DOI: 10.1097/01.tp.0000233377.14174.93; resumen.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
22.07.2009

Examinador
A. García Coca

Página
2/6

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.07.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-16	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-16	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WEINTRAUB L.A., SARWAL M.M.	oct- 2006
D02	TANNAPFEL A. et al.	01-11-2001
D03	COSENZA C.A. et al.	01-01-1995
D04	CORDOBA S.P. et al.	abril-2006
D05	FUJINO M. et al.	01-03-2004
D06	BERBERAT P.O. et al.	15-09-2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, según se recoge en las reivindicaciones 1-16, es un método para diagnosticar y/o pronosticar el estado de tolerancia en transplante hepático. El método se basa en la obtención de una muestra biológica del paciente y medir la expresión en la muestra de un grupo de genes. La medición de los niveles de expresión se realiza utilizando microarrays. También es objeto de la invención un kit para llevar a cabo el método.

El documento D01 divulga el uso de la tecnología de microarray en el campo de los trasplantes de órganos, para el pronóstico de la tolerancia al transplante y como herramienta para la monitorización de la tolerancia del paciente al transplante.

El documento D02 divulga el uso de la tecnología de microarray en el campo de los trasplantes de órganos para la identificación de genes que se expresan de forma diferencial en pacientes tolerantes y en pacientes no tolerantes.

El documento D03 divulga el importante papel que desempeñan las citoquinas en las respuestas inflamatoria e inmune en los estados no-tolerantes o rechazos a los órganos transplantados (en este caso, en transplante de hígado). Este documento también divulga un perfil de expresión de los genes que codifican para las distintas citoquinas, habiendo una expresión diferencial de dichos genes en pacientes tolerantes y en pacientes no-tolerantes al transplante de hígado.

El documento D04 divulga diferencias en los perfiles de expresión de distintos genes entre ratas tolerantes al transplante hepático y ratas que rechazan dicho transplante. La medición de los niveles de expresión se realiza utilizando microarrays.

El documento D05 divulga el uso de la tecnología de microarrays en el campo de los trasplantes de órganos para el estudio de los mecanismos de expresión de genes en células reguladoras y para la identificación de genes que se expresan de forma diferencial en ratas tolerantes y en ratas no tolerantes.

El documento D06 divulga un análisis de la expresión génica en transplante de hígado y a la identificación de genes y sets de genes, cuya expresión puede ser usada para predecir los diferentes aspectos de la progresión del estado de tolerancia en transplante de órganos en humanos.

NOVEDAD

El objeto de la invención, según se recoge en las reivindicaciones 1-16, es con referencia a los documentos D01-D06 nueva según el sentido del art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.

Hoja adicional

ACTIVIDAD INVENTIVA

Se han encontrado en el estado de la técnica, documentos que relativos al análisis de la expresión génica en transplante de hígado y a la identificación de genes y sets de genes, cuya expresión puede ser usada para predecir los diferentes aspectos de la progresión del estado de tolerancia en transplante de órganos en humanos (D02, D03 y D06), o en rata (D04 y D05)

En la solicitud, los perfiles de expresión de genes de pacientes tolerantes y no-tolerantes han sido comparados y sometidos a un análisis estadístico para identificar un pequeño set de genes cuya expresión diferencial proporcionen un pronóstico de la tolerancia al transplante hepático. Esto ya está sugerido en el documento D01, junto con la conveniencia de realizar además, un análisis estadístico (SAM y PAM) que también es realizado en la presente solicitud.

En el documento D01 se divulga la identificación de un único perfil transcripcional en pacientes tolerantes, y aunque los detalles experimentales y los resultados no se muestran, no puede ser considerado como sorprendente que los sets de genes predictivos puedan ser identificados a partir de dichos datos.

El objeto de la invención, según se recoge en las reivindicaciones 1-16, difiere de lo divulgado en el documento D01, en que en la solicitud se dan los resultados de dichos análisis. Sin embargo, a la vista de que el método de screening y el análisis estadístico son obvios y en cierta forma rutinarios, el experto en la materia tendría una expectativa razonable de éxito a la hora de identificar genes o sets de genes asociados a la tolerancia al transplante hepático, por lo que no se le reconoce una contribución al estado de la técnica. Por lo tanto, el objeto de la invención según se recoge en las reivindicaciones 1-16, se considera que carece de actividad inventiva, según el artículo 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.