

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 212**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2012 PCT/AU2012/001210**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13049892**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2012 E 12839093 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2764124**

54 Título: **Ensayo de diagnóstico para determinar el estado de trasplante de tejidos**

30 Prioridad:

**07.10.2011 AU 2011904235**

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

**12.12.2017**

73 Titular/es:

**MURDOCH CHILDRENS RESEARCH INSTITUTE  
(100.0%)**

**Royal Children's Hospital Flemington Road  
Parkville, VIC 3052, AU**

72 Inventor/es:

**SLATER, HOWARD ROBERT;  
BRUNO, DAMIEN LUIS y  
GANESAMOORTHY, DEVIKA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 646 212 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**

Ensayo de diagnóstico para determinar el estado de trasplante de tejidos

**5 DATOS DE PRESENTACIÓN**

La presente solicitud está asociada con y reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional australiana nº 2011904235, presentada el 7 de octubre de 2011, con el título "Ensayo de diagnóstico para determinar el estado de trasplante de tejidos".

10

**CAMPO**

La presente descripción se refiere en general a trasplante de tejidos, incluidos órganos. En la presente memoria descriptiva se enseña un ensayo de diagnóstico de base genética para determinar el estado de un procedimiento de trasplante de tejido en un receptor basado en una caracterización de un material acelular de ácidos nucleicos circulantes u otros. La presente descripción permite definir kits, cebadores y protocolos para determinar el estado de un procedimiento de trasplante.

15

**ANTECEDENTES**

20

Al final de la descripción se recogen en orden alfabético los detalles bibliográficos de las publicaciones referidas por el autor de la presente memoria descriptiva.

Las referencias a cualquier técnica anterior en la presente memoria descriptiva no constituyen, y no deben entenderse como tales, un reconocimiento o cualquier forma de indicación de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en cualquier país.

25

El trasplante de tejidos, incluidos órganos, es un procedimiento médico importante para sustituir un tejido enfermo o traumatizado en un receptor paciente por un tejido de donante de un donante compatible genéticamente o con histocompatibilidad. El éxito o no de un procedimiento de trasplante se determina en la actualidad principalmente por un análisis histológico invasivo de material de biopsia. Sin embargo, el análisis histológico tiene un alto grado de error de muestreo, es invasivo, tiene baja sensibilidad, puede causar potencialmente daños en el tejido, requiere un alto grado de experiencia técnica y por tanto resulta costoso.

30

A escala mundial, el número de pacientes que necesitan un trasplante de órganos supera con mucho la disponibilidad de órganos adecuados. La capacidad de identificar de forma temprana el rechazo del órgano trasplantado permitiría a un médico intervenir con un tratamiento inmunosupresor adecuado y salvar el órgano y potencialmente la vida del paciente. La reducción del nivel de insuficiencia del órgano debido al rechazo aumenta la disponibilidad de órganos de donantes para otros pacientes y reduce significativamente el coste global.

35

Los trasplantes de riñón suponen más del 50% de todos los trasplantes de órganos en Australia. Este porcentaje probablemente aumentará con el tiempo donde el número de pacientes que reciben diálisis aumenta a un ritmo de aproximadamente el 60% al año. En 2010, el coste de proporcionar diálisis y servicios de trasplante de riñón fue de aproximadamente 1.000 millones de dólares australianos (Howard y col. (2009) *Nephrology* 14:123-132; Cass y col. (2010) *Kidney Health Australia* 27).

40

El coste medio de proporcionar diálisis es de 61.659 dólares australianos por persona y año. Este valor contrasta con los 81.549 dólares australianos para un trasplante de riñón con costes adicionales de 11.770 dólares australianos al año. Por ello, la capacidad de facilitar con éxito trasplantes de riñón presenta importantes beneficios económicos aparte de la mejora en la esperanza de vida y la mejor calidad de vida para los receptores de un trasplante de riñón con éxito en comparación con los que reciben diálisis.

45

La presencia de ADN circulante o sin células fue comunicada por primera vez por Mandel y col. (1948) *C.R. Acad. Sci Paris* 142:241-243. El ADN circulante puede aparecer después de procesos como la apoptosis y la necrosis de tejido (Giacona y col. (1998) *Pancreas* 17:89-97). En pacientes con cáncer, el ADN circulante puede identificarse como procedente de células cancerosas sobre la base de oncogenes, alteraciones de microsatélites y otros biomarcadores genéticos en el ADN (Diehl y col. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 102:16368-16373; Diehl y col. (2008) *Nat. Med.* 14:985-990). Por ello, el ADN circulante se ha usado en estudios de genotipado para detectar procesos patológicos y como un indicador de la salud de una persona o un feto.

50

55

60

- La solicitud de patente internacional nº WO-2011/057.061 propuso un enfoque genético para vigilar la presencia de ADN de tejido de donante en una muestra del receptor. El procedimiento se basó en determinar un perfil genético del ADN del receptor y el donante de manera que la detección de ADN del donante libre proporciona una indicación de que las células del donante se estaban destruyendo. El enfoque propuesto exigía, sin embargo, el genotipado del receptor y el donante con el fin de determinar un marcador genético apropiado que fuera definitivamente ácido nucleico del donante. Además, el perfil genético se centraba principalmente en mutaciones o polimorfismos tales como polimorfismos de nucleótidos individuales, repeticiones en tándem en número variable, minisatélites, polimorfismos de di-, tri- y tetra-nucleótido y similares.
- 10 Lee y col. (2006) *Transfusion* 46:1870-1878 utilizaron polimorfismos de inserción-delección bialélicos para caracterizar el microquimerismo. Posteriormente, Abbott Laboratories produjo un ensayo basado en PCR en tiempo real para detectar 34 polimorfismos de inserción-delección bialélicos.
- 15 Wu y col. (2009) *Nature Medicine* 15(2):215-219 usaron sondas de delección polimórfica para identificar y llevar un seguimiento del quimerismo celular entre el tejido del receptor y del donante, principalmente para determinar el éxito o no del injerto de células madre. Los autores propusieron que la detección polimórfica de deleciones complementaría pero no sustituiría las técnicas establecidas usadas para el seguimiento del quimerismo genético. Se encontró que el análisis de sondas de delección polimórfica basado en FISH no era tan sensible como el análisis de receptores en tándem cortos basado en PCR para detectar los niveles de quimerización de menos del 5%.
- 20 Sin embargo, los polimorfismos de inserción-delección se asocian normalmente con pequeñas deleciones de nucleótidos seguidas por un pequeño número de inserciones de nucleótidos (de algunas hasta decenas de pb). En términos de su detección por metodologías de PCR existe en general compartición de identidad de secuencias entre los alelos naturales e indel, lo que tiene una incidencia (negativa) en la relación señal-ruido para la cuantificación de quimerismo de ADN.
- 25 Por tanto existe una necesidad clara de manejar mejor los procedimientos de trasplante de tejidos, incluidos órganos, con el fin de asegurar una alta tasa de supervivencia de órganos de trasplante. Esta necesidad se satisface mediante una capacidad para detectar rechazos en una fase temprana usando un enfoque sensible de base genética.
- 30

## RESUMEN

La presente descripción enseña un procedimiento para determinar el estado de un tejido de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos circulantes que tienen un polimorfismo de variación en el número de copias (CNV) que indica que los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos procedentes de un donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular en el tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular mínimo o clínicamente aceptable. En una realización, la CNV es un polimorfismo de delección de número de copias (CND) que es uno de entre un panel de polimorfismos de CND donde un receptor dado se caracteriza por tener un genotipo nulo para al menos un polimorfismo de CND en el panel y el trasplante de donante por tener un genotipo no nulo para este polimorfismo de CND. En una realización, no es preciso que el genotipo del donante con respecto a los polimorfismos de CND se determine directamente. Además, no es preciso determinar la presencia o ausencia del polimorfismo por secuenciación de nucleótidos ni por microquimerismo bialélico. En la Tabla 2 se indican ejemplos de polimorfismos de CNV. En una realización, las CNV son CND tal como se indica en la Tabla 3.

35

40

45

La CNV se define mediante una secuencia de ADN que varía en el número de copias entre las personas en la población, la longitud de la secuencia de ADN afectada puede variar desde varios centenares de pares de bases hasta varios millones de pares de bases. En cambio, las deleciones del nivel de secuencias implican secuencias de ADN más cortas, normalmente en el intervalo de 1 pb a 100 pb. La inserción-delección se describe como una delección de secuencia de ADN (normalmente unos pares de bases) seguido por una inserción de secuencia de ADN (normalmente unos pares de bases) después de los nucleótidos sometidos a delección.

50

55

El uso de lugares de delección de CNV permite consultar las grandes secuencias de ADN (por qPCR u otra metodología molecular) que están ausentes en el receptor, evitando así completamente la cuestión de distinguir entre ADN de donante del ADN de receptor de base y llevando a mejoras en la relación señal-ruido para la medida de niveles de ADN diana.

60

La referencia a "tejido" incluye un órgano, extremidad y apéndice así como microtejidos y células madre. Los ejemplos de órganos incluyen un riñón, un corazón, un pulmón, un islote pancreático, un hígado, un intestino y la piel.

5 Los ejemplos de extremidades incluyen una pierna, un brazo, una mano y un pie. Los ejemplos de un apéndice incluyen un dedo del pie, una nariz y una oreja. Los ejemplos de células madre incluyen células madre de adulto y embrionarias. La muestra que se somete a cribado de ácidos nucleicos libres se selecciona de entre plasma, sangre entera, suero, orina, pus, líquido respiratorio, líquido linfático, heces, bilis, saliva, esputo, semen, flujo vaginal, líquido cefalorraquídeo, líquido cerebral, ascitis, leche, secreciones de las vías genitourinarias y un lavado de un tejido u

10 órgano (por ejemplo, un pulmón) En una realización, la muestra es plasma, sangre entera o suero. En una realización, la muestra es orina. Un ácido nucleico "libre" incluye un ácido nucleico circulante y se refiere a ácido nucleico liberado después de un daño celular. El daño celular puede proceder de procesos tales como apoptosis o necrosis, citotoxicidad de fármacos o una reacción de rechazo de base inmunológica.

15 Otro aspecto contemplado en la presente memoria descriptiva es un protocolo de trasplante para trasplantar tejido desde un donante a un receptor, comprendiendo el protocolo el trasplante del tejido y después el seguimiento de la muestra del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos circulantes que son de células del donante donde si se detectan ácidos nucleicos del donante, el receptor se somete a terapia de inmunosupresión o, si el paciente está en terapia de inmunosupresión, la terapia puede modificarse.

20 La descripción objeto enseña además un ensayo para llevar un seguimiento del equilibrio entre la inmunosupresión y el daño en el tejido debido por ejemplo a rechazo o citotoxicidad farmacéutica. Por ello, la descripción objeto enseña un procedimiento para tratar a un sujeto que se ha sometido a un procedimiento de trasplante mediante supervisión de los cambios en los niveles de ácidos nucleicos del donante. Dichos cambios pueden darse con respecto a un

25 control. El control incluye los niveles antes del trasplante de ácidos nucleicos libres del receptor o un cambio en la proporción entre ácidos nucleicos totales y ácidos nucleicos del donante.

Además se proporciona el uso de un panel de CNV tal como CND que identifica un ácido nucleico como de origen de un donante o, por deducción, de origen no de un receptor en la fabricación de un ensayo de diagnóstico para

30 detectar el estado de un tejido trasplantado en el receptor. En una realización, uno entre el receptor o el donante tiene un genotipo nulo con respecto a al menos uno de los polimorfismos de CND y el otro entre el receptor o el donante no lo tiene.

La Tabla 2 proporciona una lista de CNV comunes que son características del ADN de un receptor. La lista de la

35 Tabla 2 debe leerse conjuntamente con, e incluye, otras CNV conocidas como las definidas en Conrad y col. (2010) Nature 464:704-712; McCarroll y col. (2008) Nat Genet 40(10):1166-1174. En la Tabla 3 se indica un grupo de 10 CNV, en forma de CND. En una realización, está presente al menos un genotipo nulo de CND en cualquier receptor dado. No es necesario obtener el genotipo del donante ya que los polimorfismos de CND se seleccionan de manera que existe aproximadamente una probabilidad del 50% de que si un receptor tiene un genotipo CND nulo, el donante

40 no lo tendrá. En receptores de trasplantes que muestran signos clínicos de rechazo variables, las concentraciones en plasma de ácidos nucleicos específicas del donante pueden variar, lo que está relacionado con el mecanismo inmunológico de rechazo (es decir, humoral frente a celular) así como con la categoría médica del rechazo (es decir, agudo frente a crónico).

45 En la Tabla 1 se definen las siguientes abreviaturas usadas en la memoria descriptiva.

**Tabla 1**  
**Abreviaturas**

<b>Abreviatura</b>	<b>Definición</b>
AP-PCR	PCR cebada arbitrariamente
ADNcf	ADN libre circulante
CND	Delección de número de copias
CNV	Variante de número de copias
CP-PCR	PCR cebada con secuencia de consenso
DOP-PCR	PCR de oligonucleótido-cebador degenerada
MF-PCR	PCR fluorescente múltiple
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR/RFLP	PCR de longitud de fragmento de restricción
q-PCR	PCR cuantitativa

qf-PCR	PCR fluorescente cuantitativa
RT-PCR	PCR en tiempo real
NABSA	Amplificación de secuencias basada en ácidos nucleicos
Genotipo nulo	Copias cero de un marcador genético (nulisómico)
SRY	Región Y de determinación del sexo

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Se hace referencia a un "CND\_0X" donde X es un número de 1 a 10. Existen CNV que se definen en la Tabla 3 y se seleccionan a partir de la Tabla 2.

**Figura 1** es una representación esquemática y fotográfica de (a) CND\_01 PCR interna: la región sombreada indica el segmento de delección. Las pistas 2-22 son 21 muestras de control (12/21-copia nula, 9/21- 1 o 2 copias), pistas 1 y 24 - Marcador VIII y pista 23-muestra en blanco; (b) CND\_01 PCR flanqueante: las pistas 2-22 son las mismas 21 muestras de control (19/21 son nulas o 1 copia; 2/21 son tipo natural de 2 copias (flecha); pista 1 y 24 - Marcador VIII y pista 23 - muestra en blanco.

**Figura 2** es una representación fotográfica de PCR interna en ADN celular y de plasma para CND\_02:- Para 4 muestras de control, la muestra de ADN celular y de plasma se sometió a ensayo en pistas alternas (pista 2 a 9). La diferencia en la intensidad de banda se debe a las diferentes cantidades de ADN en la muestra de plasma y celular (el ADN celular es equivalente a -19000 GE, mientras que el ADN de plasma es equivalente a -250GE en la reacción).

**Figura 3** es una representación fotográfica de sensibilidad de genotipado de delección de CNV. La sensibilidad fue de solo el 1%.

**Figura 4** es una representación gráfica de la detección de una región Y de determinación del sexo no propia (SRY). El ADN en el plasma sanguíneo del receptor usa PCR cuantitativa (q-PCR).

**Figuras 5a a c** son representaciones gráficas de CND\_01, CND\_02 y CND\_03 que muestran medidas exactas, precisas y robustas de ADN raro.

**Figura 6** es una representación fotográfica de PCR interna en ADN celular y de plasma para la muestra del paciente. Pistas 2-5 CND\_02 (no informativas ya que el receptor y el donante son 'nulos'), pista 7-10 CND\_03 (informativa), pista 12-15 CND\_08 (informativa).

**Figuras 7a y b** son representaciones gráficas de ADNc derivado del trasplante en plasma (a) y ADNcf total (b) para 35 receptores de trasplante. En los receptores de trasplante que experimentan signos clínicos de rechazo, se encontró que las concentraciones de ADN en plasma específicas del donante variaban y este hecho parecía estar relacionado con el mecanismo inmunológico de rechazo (es decir, de mediación humoral frente a celular) así como con la categoría médica del rechazo (es decir, aguda frente a crónica).

**Figuras 8a y b** son representaciones gráficas de ADNcf derivado del plasma (a) y ADNcf de plasma total (b) en los receptores de antes y después del trasplante.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente memoria descriptiva, salvo que del contexto se derive lo contrario, se entenderá que el término "comprenden" o variaciones como "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un elemento declarado o un número entero o una etapa del procedimiento o un grupo de elementos o números enteros o etapas del procedimiento pero no la exclusión de ningún elemento o número entero o etapa de procedimiento o grupo de elementos o números enteros o etapas de procedimiento.

Tal como se usa en la memoria descriptiva objeto, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen los aspectos singular y plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a una "variante del número de copias" incluye una única variante del número de copias, así como dos o más variantes del número de copias diferentes; la referencia a "un órgano" incluye un único órgano, así como dos o más órganos; la referencia a "la descripción" incluye uno o varios aspectos enseñados por la descripción; y así sucesivamente. Los aspectos enseñados y contemplados en la presente memoria descriptiva están comprendidos por el término "invención". Todos dichos aspectos están contemplados en el alcance de las reivindicaciones.

La presente descripción enseña un ensayo no invasivo para valorar el resultado de un procedimiento de trasplante de tejido. El ensayo se basa en la identificación de ácidos nucleicos no del receptor (es decir, ácidos nucleicos del donante) en una muestra biológica del receptor de tejido trasplantado a partir del donante. Por "identificación" se incluye caracterización y cuantificación. El ensayo caracteriza un polimorfismo de variante del número de copias (CNV), tal como una delección del número de copias (CND), que identifica el ácido nucleico del donante en una mezcla de ácido nucleico del receptor en la muestra. La CNV tal como una CND no requiere análisis de secuencias o análisis de microquimerismo bialélico. El daño en un tejido trasplantado activa la liberación de ácidos nucleicos del donante desde las células trasplantadas en el sistema circulatorio y otros líquidos del receptor. Puede llevarse un seguimiento del estado del tejido trasplantado e identificarse los signos tempranos de daño celular que llevarán a la intervención clínica apropiada para salvar el tejido. El daño celular puede proceder entre otros de un rechazo de base inmunológica, apoptosis, necrosis, citotoxicidad farmacológica, traumatismo, isquemia de flujo sanguíneo e infección. La intervención clínica puede implicar la administración de fármacos inmunosupresores, si el paciente está en terapia de inmunosupresión, un cambio en la dosis del fármaco o el tipo de fármaco. Otras intervenciones incluyen terapia antipatógenos, fármacos para mejorar el flujo sanguíneo o protocolos para reducir la tumefacción o los traumatismos en el tejido. El ensayo puede aplicarse universalmente a todos los procedimientos de trasplante sin necesidad de determinar directamente el genotipo del polimorfismo de CNV del donante. La detección de un polimorfismo de CNV permite un enfoque altamente sensible de identificación de ADN humano no del receptor. En una realización, el receptor tiene un genotipo nulo con respecto al polimorfismo de CNV y el donante no lo tiene. Alternativamente, el donante tiene un genotipo nulo con respecto al polimorfismo de CNV y el receptor no lo tiene.

Un CNV es una variante genómica estructural, que mide 1 kb de longitud o más (por ejemplo, 1 kb-10<sup>8</sup> kb), que produce cambios confinados en el número de copias en una región cromosómica específica. Si su frecuencia de alelos de población es inferior al 1%, se refiere como variantes (CNV) que incluyen inserciones y delecciones así como cambios más complejos que afectan a las ganancias y pérdidas en el mismo locus. La CNV se definió originalmente como inserciones y delecciones de más de 1 kb de tamaño (Feuk y col. (2006) Nature Rev 7:85-97). Con el tiempo, con la profusión de datos procedentes de la secuenciación de genomas humanos (The 1000 Genomes Project Consortium (2010) Nature 467:1061-1073), el espectro operativo de variantes del número de copias (CNV) se ha ampliado para incluir episodios mucho menores (por ejemplo, de >50 pb de longitud). Estos se distinguen de los polimorfismos de delección de secuencias pequeñas (también denominados cambios de base individual) por su tamaño genómico (Weber y col. (2002) Am J Human Genet 71:854-862).

Los polimorfismos de CNV se seleccionan sobre la base de que debido a su alta incidencia en la población, un receptor se caracterizará por tener ácidos nucleicos con al menos un genotipo de CNV y una probabilidad del 50% de que si un receptor o donante tiene un genotipo CNV dado, entonces el otro entre el receptor o el donante no lo tendrá. En una realización, el ácido nucleico del receptor se caracteriza por ser nulisómico para al menos uno de los sitios de CNV y el donante no lo es.

Por consiguiente, la presente descripción enseña un procedimiento para determinar el estado de un tejido de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos circulantes que tienen un polimorfismo de variación en el número de copias (CNV) que indica que son ácidos nucleicos del donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable. Un "nivel aceptable" significa efectos secundarios clínicos adversos mínimos.

La detección de ácidos nucleicos del donante significa la detección de material de ácidos nucleicos procedente no del receptor que a su vez es indicativa de rechazo al trasplante u otro daño en el trasplante que incluye apoptosis, necrosis, isquemia, traumatismo o infección. El daño puede deberse también a un fármaco administrado al paciente tal como un fármaco de inmunosupresión. La ausencia de ácidos nucleicos del donante significa que el material de ácidos nucleicos no del receptor no se está liberando lo que es indicativo de un trasplante sano o con éxito. No es necesario determinar el genotipo del polimorfismo de CNV del donante para que el ensayo sea eficaz. Se somete a cribado un panel de polimorfismos de CNV sobre la base de que cualquier receptor dado tendrá o no tendrá al menos uno de estos polimorfismos y el donante tendrá o no tendrá un polimorfismo diferente al del receptor. En una realización, el receptor es nulisómico para al menos uno de los sitios de CNV en el panel y el donante no lo es. En otra realización, el donante es nulisómico para al menos uno de los sitios de CNV en el panel y el receptor no lo es. Además, en los receptores de trasplante que experimentan signos clínicos variables de rechazo, las concentraciones de ácidos nucleicos en plasma específicas del donante pueden variar lo cual guarda relación con el mecanismo inmunológico de rechazo (es decir, humoral frente a celular) así como la categoría médica del rechazo (es decir, agudo frente a crónico).

En consecuencia, la presente memoria descriptiva enseña un procedimiento para determinar el estado de un tejido de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de ácidos nucleicos circulantes en la muestra del receptor para determinar la presencia de un polimorfismo de CNV seleccionado de entre un panel de 5 polimorfismos donde los ácidos nucleicos del donante comprenden la presencia o ausencia de al menos un polimorfismo no compartido por el receptor donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos no del receptor o un nivel de ácidos nucleicos no del receptor con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable aunque no se limita a la salud continuada de un paciente.

10

En una realización relacionada, la presente memoria descriptiva facilita un procedimiento para determinar el estado de un tejido de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 200 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 200 polimorfismos de CNV conocidos, el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos circulantes con la presencia de 15 ácidos nucleicos con los de 1 a 200 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los ácidos nucleicos del donante se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos nucleicos del donante se distinguen del receptor basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos no del receptor o un nivel de ácidos nucleicos no del receptor con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable. En una 20 realización, el panel comprende de 1 a 100 pares de oligonucleótidos dirigidos a 1 a 100 polimorfismos de CNV. En una realización, existen de 1 a 10 pares de oligonucleótidos dirigidos a 1 a 10 polimorfismos de CNV. Por "1 a 200" se entiende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 25 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 30 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 ó 200.

La referencia a "tejido" con respecto a trasplante incluye un órgano, extremidad, apéndice y piel así como microtejido y células madre. Los ejemplos de órganos incluyen riñón, corazón, pulmón, islote pancreático, hígado, intestino y piel. Una extremidad incluye una pierna, un brazo, una mano y un pie. Un apéndice incluye un dedo del pie, una 35 nariz y una oreja.

En una realización, el tejido es un órgano seleccionado de entre la lista que consiste en un riñón, un corazón, un pulmón, un islote pancreático, un hígado, un intestino y la piel.

40 Por tanto, la presente descripción enseña un procedimiento para determinar el estado de un órgano de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos circulantes que tienen un polimorfismo de CNV que indica que no son los ácidos nucleicos del receptor donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel 45 aceptable.

La presente memoria descriptiva enseña además un procedimiento para determinar el estado de un órgano de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de ácidos nucleicos circulantes en una muestra del receptor para determinar la presencia de polimorfismo de CNV seleccionado de entre un panel de 50 polimorfismos donde los ácidos nucleicos del receptor comprenden la presencia o ausencia de al menos un polimorfismo no compartido por el donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel 55 aceptable.

En una realización, la presente memoria descriptiva permite un procedimiento para determinar el estado de un órgano de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 200 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 200 polimorfismos de CNV conocidos, el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos circulantes con la presencia de ácidos 60

nucleicos con los de 1 a 200 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los ácidos nucleicos del receptor se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos nucleicos del donante se distinguen del donante basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos no del receptor o un nivel de ácidos nucleicos no del receptor con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

En una realización, la presente memoria descriptiva permite un procedimiento para determinar el estado de un órgano de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 100 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 100 polimorfismos de CNV conocidos, el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos circulantes con la presencia de ácidos nucleicos con los de 1 a 100 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los ácidos nucleicos del receptor se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos nucleicos del donante se distinguen del donante basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos no del receptor o un nivel de ácidos nucleicos no del receptor con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

En una realización, la presente memoria descriptiva permite un procedimiento para determinar el estado de un órgano de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 10 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 10 polimorfismos de CNV conocidos, el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos circulantes con la presencia de ácidos nucleicos con los de 1 a 10 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los ácidos nucleicos del receptor se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos nucleicos del donante se distinguen del donante basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos no del receptor o un nivel de ácidos nucleicos no del receptor con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

En una realización, el tejido es un órgano seleccionado de entre la lista que consiste en un riñón, un corazón, un pulmón, un islote pancreático, un hígado, un intestino y la piel.

En una realización, el órgano es un riñón.

Por consiguiente, la presente descripción enseña un procedimiento para determinar el estado de un riñón de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos circulantes que tienen un polimorfismo de CNV que indica que no son los ácidos nucleicos del receptor donde la presencia de ácidos nucleicos no del receptor es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos no del receptor o un nivel de ácidos nucleicos no del receptor con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable para que un paciente disfrute de buena salud continuada. Por "no receptor" se entiende "donante".

La presente memoria descriptiva enseña también un procedimiento para determinar el estado de un riñón de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de ácidos nucleicos circulantes en la muestra del receptor para determinar la presencia de polimorfismo de CNV seleccionado de entre un panel de polimorfismos donde los ácidos nucleicos del receptor comprenden la presencia o ausencia de al menos un polimorfismo no compartido por el donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

En una realización, la presente memoria descriptiva permite un procedimiento para determinar el estado de un riñón de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 200 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 200 polimorfismos de CNV conocidos, el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos circulantes con la presencia de ácidos nucleicos con los de 1 a 200 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los ácidos nucleicos del receptor se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos nucleicos del donante se distinguen del receptor basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos no del receptor o un nivel de ácidos nucleicos no del receptor con respecto a un control



es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable para que un paciente disfrute de buena salud continuada.

5 En una realización, la presente memoria descriptiva permite un procedimiento para determinar el estado de un riñón de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 100 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 100 polimorfismos de CNV conocidos, el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos circulantes con la presencia de ácidos nucleicos con los de 1 a 100 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los ácidos nucleicos del receptor se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos  
10 nucleicos del donante se distinguen del receptor basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos no del receptor o un nivel de ácidos nucleicos no del receptor con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable para que un paciente disfrute de buena salud continuada.

15

En una realización, la presente memoria descriptiva permite un procedimiento para determinar el estado de un riñón de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 10 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 10 polimorfismos de CNV conocidos, el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos circulantes con la presencia de ácidos  
20 nucleicos con los de 1 a 10 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los ácidos nucleicos del receptor se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos nucleicos del donante se distinguen del receptor basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos no del receptor o un nivel de ácidos nucleicos no del receptor con respecto a un control  
25 es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable para que un paciente disfrute de buena salud continuada.

El "estado" del tejido trasplantado significa la presencia o ausencia de algún daño celular en el tejido trasplantado. La presencia de daño en el tejido se indica mediante la liberación de ácidos nucleicos de las células del tejido de  
30 donante trasplantado en el receptor. El estado es el resultado del ensayo. Los ácidos nucleicos liberados se refieren en la presente memoria descriptiva como ácidos nucleicos "libres" o "circulantes" (por ejemplo, ADN libre circulante [ADNcf]). La muestra incluye plasma, sangre entera, suero, orina, pus, líquido respiratorio, líquido linfático, heces, bilis, saliva, esputo, semen, flujo vaginal, líquido cefalorraquídeo, líquido cerebral, ascitis, leche, secreciones de las vías genitourinarias y un lavado de un tejido u órgano (por ejemplo, un pulmón). En una realización, la muestra es  
35 plasma, sangre entera o suero. En una realización, la muestra es orina. Por tanto, los aspectos contemplados en la presente memoria descriptiva incluyen el ensayo en líquido biológico de ácidos nucleicos libres circulantes, tales como ADNcf.

Un ácido nucleico "libre" incluye un ácido nucleico circulante (por ejemplo, ADNcf) y se refiere a un ácido nucleico  
40 liberado después de un daño celular. El daño celular puede proceder de procesos como entre otros apoptosis o necrosis, citotoxicidad de fármacos o una reacción de rechazo de base inmunológica.

El ensayo se basa en la detección en el nivel de presencia o ausencia de no receptor (es decir, procedente del donante) de ácidos nucleicos. Los niveles de ácidos nucleicos procedentes de un donante también pueden seguirse  
45 con el tiempo tal como después de un trasplante o después de la administración de fármacos de inmunosupresión u otras terapias. La detección de ácidos nucleicos procedentes de un donante puede usarse también para valorar la probabilidad de que el tejido trasplantado sobreviva o requiera la eliminación y/o para valorar la toxicidad de un fármaco que se suministra a un paciente. El daño en el tejido incluye rechazo inmunológico, apoptosis, necrosis, traumatismo, lesión isquémica, infección por un patógeno, isquemia perioperatoria, lesión por reperfusión,  
50 hipertensión, lesiones debidas a especies de oxígeno reactivo y toxicidad farmacéutica.

Pueden usarse términos como "diagnóstico", "pronóstico", "determinación", "monitor", "ensayo" y similares para describir la metodología de detección de ácidos nucleicos del donante o ácidos nucleicos que no son de origen del receptor. El ensayo de diagnóstico puede usarse también en un protocolo para llevar un seguimiento de la salud de  
55 un paciente con respecto al estado del tejido trasplantado y/o el nivel de toxicidad de los fármacos que se administran al paciente.

Por tanto, el procedimiento facilitado en la presente memoria descriptiva proporciona un medio para valorar el estado o resultado del trasplante. El estado o resultado puede estar comprendido entre el rechazo al trasplante y la  
60 tolerancia al trasplante o cualquier forma de daño celular. El daño en el tejido se pone de relieve mediante la

detección de ácidos nucleicos no del receptor (es decir, tejido procedente del donante). Estos son liberados en diversos líquidos en el receptor después de la apoptosis de las células del tejido de donante. La tolerancia al trasplante o la ausencia de daño en el tejido se pone de relieve por la ausencia de ácidos nucleicos procedentes de un donante o un nivel de ácidos nucleicos procedentes de un donante que con respecto a un control es indicativa de 5  
daño celular mínimo o un nivel de daño celular que es clínicamente aceptable para la buena salud continuada del paciente. La evidencia de tolerancia al trasplante proporciona una indicación de que el trasplante sobrevivirá probablemente o al menos estará sano en cualquier periodo de tiempo dado.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el diagnóstico o pronóstico del estado del trasplante incluye la 10  
predicción, evaluación, determinación y diagnóstico del estado o resultado del trasplante y en algunos casos la probabilidad de que un paciente sobreviva a un procedimiento de trasplante o a un protocolo médico posterior a un trasplante.

El polimorfismo de CNV puede ser una delección, una inserción o una expansión. En una realización, es una delección 15  
de CNV, referida en la presente memoria descriptiva como una delección del número de copias CND o polimorfismo de CND.

Se selecciona un panel de delecciones de CNV que se espera que tengan frecuencias nulas aproximadas del 40-50% en la población general. Esto se lleva a cabo mediante un análisis *in silico* de datos públicos (Conrad y 20  
col. (2010) ver más arriba; McCarroll y col. (2008) ver más arriba). Estas regiones de CNV son polimórficas y no tienen significación clínica intrínseca. La selección de CNV y los cálculos de frecuencias se realizan del modo siguiente: El conjunto de datos HapMap incluye una función trio-data para cada CNV. Para los cálculos de frecuencias, sólo se incluyen muestras singleton y parentales. Las CNV con sólo genotipos de 0, 1 y 2 copias se seleccionan para su análisis (es decir, CNV de más de 2 copias y se excluyen CNV de cromosomas X e Y). Para 25  
cada CNV seleccionada, se calculan las frecuencias de genotipos de 0, 1 y 2 copias. Se excluyeron las CNV en forma de solapamiento de CND con duplicaciones de segmentos. De la Tabla 2 se seleccionaron CNV con frecuencia de 0,4-0,5 copias nulas y menos de 3 kb de tamaño. En la Tabla 3 se indica un ejemplo de las CND.

La Tabla 2 proporciona una lista de sitios de CNV comunes que están presentes normalmente en el ácido nucleico 30  
del receptor. La lista de la Tabla 2 debe leerse conjuntamente con, e incluye, otras CNV conocidas como las definidas en Conrad y col. (2010) ver más arriba; McCarroll y col. (2008) ver más arriba. En la presente memoria descriptiva se incluye un aspecto en el que el receptor es nulisómico para al menos uno de los sitios de CND y el donante no lo es. En otra realización, el donante es nulisómico para un sitio de CND y el receptor no lo es. No es necesario obtener el genotipo del donante ya que existe una probabilidad de 1 sobre 2 (probabilidad del 50%) de 35  
que si un receptor tiene un sitio de CND dado, el donante no lo tenga, o a la inversa. La Tabla 3 es un ejemplo de un panel de sitios de CND adecuados útiles en la práctica del presente ensayo. Los CND de la Tabla 3 se refieren como "CND\_0X" donde X es un número de 1 a 10. Estos valores están correlacionados con un ID de CNP en la Tabla 2 por medio de su CNP\_id. en la Tabla 3.

Por tanto, la memoria descriptiva objeto enseña un procedimiento para determinar el estado de un tejido de donante 40  
trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos circulatorios que tienen o no un polimorfismo de CND que indica que son ácidos nucleicos del donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del 45  
donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

En la presente memoria descriptiva se enseña además un procedimiento para determinar el estado de un tejido de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de ácidos nucleicos circulatorios en 50  
la muestra del receptor para determinar la presencia de polimorfismo de CNV seleccionado de entre un panel de polimorfismos donde los ácidos nucleicos del receptor comprenden la presencia o ausencia de al menos un polimorfismo no compartido por el donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel 55  
aceptable.

En una realización, la presente memoria descriptiva permite un procedimiento para determinar el estado de un tejido de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 200 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 200 polimorfismos de CNV conocidos, el cribado de una 60  
muestra del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos con la presencia de ácidos nucleicos

5 circulatorios con los de 1 a 200 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los ácidos nucleicos del receptor se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos nucleicos del donante se distinguen del receptor basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de apoptosis de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos no del receptor o un nivel de ácidos nucleicos no del receptor con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

10 En una realización, la presente memoria descriptiva permite un procedimiento para determinar el estado de un tejido de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 100 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 100 polimorfismos de CNV conocidos, el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos con la presencia de ácidos nucleicos circulatorios con los de 1 a 100 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los ácidos nucleicos del receptor se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos nucleicos del donante se distinguen del receptor basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de apoptosis de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos no del receptor o un nivel de ácidos nucleicos no del receptor con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

20 En una realización, la presente memoria descriptiva permite un procedimiento para determinar el estado de un tejido de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 10 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 10 polimorfismos de CNV conocidos, el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos con la presencia de ácidos nucleicos circulatorios con los de 1 a 10 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los ácidos nucleicos del receptor se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos nucleicos del donante se distinguen del receptor basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de apoptosis de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos no del receptor o un nivel de ácidos nucleicos no del receptor con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

30 En una realización, el polimorfismo de CNV panel se selecciona de entre la lista de la Tabla 2 donde el receptor se caracteriza por tener el genotipo nulo para al menos una región de CNV en el panel donde la presencia de ácidos nucleicos caracterizados por no tener el genotipo nulo para al menos una región de CNV en el panel indica que los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos no del receptor donde la presencia de ácidos nucleicos del donante (no del receptor) es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante (no del receptor) o un nivel de ácidos nucleicos no del receptor con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

Un ejemplo de un panel de CNV es el panel de CND indicado en la Tabla 3.

40 Por consiguiente, la presente descripción enseña un procedimiento para determinar el estado de un órgano de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos circulatorios que tienen un polimorfismo de CNV seleccionado de entre la lista de la Tabla 2 donde los ácidos nucleicos caracterizados por no tener el genotipo nulo para al menos una región de CNV en el panel indica ácidos nucleicos son ácidos nucleicos del donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

50 En una realización, la presente descripción enseña un procedimiento para determinar el estado de un órgano de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos circulatorios que tienen un polimorfismo de CND seleccionado de entre la lista de la Tabla 3 donde los ácidos nucleicos caracterizados por no tener el genotipo nulo para al menos una región de CND en el panel indica ácidos nucleicos que son ácidos nucleicos del donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

60 La presente memoria descriptiva permite un procedimiento para determinar el estado de un órgano de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 200 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 200 polimorfismos de CNV conocidos seleccionado de entre

la lista indicada en la Tabla 2, el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos con la presencia de ácidos nucleicos circulatorios con los de 1 a 200 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los ácidos nucleicos del receptor se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos nucleicos del donante se distinguen del receptor basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos no del receptor o un nivel de ácidos nucleicos no del receptor con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

10 La presente memoria descriptiva enseña además un procedimiento para determinar el estado de un órgano de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de ácidos nucleicos circulatorios en la muestra del receptor para determinar la presencia de polimorfismo de CNV seleccionado de entre un panel de polimorfismos tal como se indica en la Tabla 2 donde los ácidos nucleicos del receptor comprenden la presencia o ausencia de al menos un polimorfismo no compartido por el donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

En una realización, el tejido es un órgano seleccionado de entre la lista que consiste en un riñón, un corazón, un pulmón, un islote pancreático, un hígado y un intestino.

La presente descripción también enseña un procedimiento para determinar el estado de un riñón de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos circulatorios que tienen un polimorfismo de CNV seleccionado de entre la lista indicada en la Tabla 2 donde la presencia de ácidos nucleicos que no tienen el genotipo nulo para al menos una región de CNV en el panel indica que los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos del donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

La presente memoria descriptiva permite un procedimiento para determinar el estado de un tejido de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 50 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 200 polimorfismos de CNV conocidos tales como los seleccionados de entre la lista indicada en la Tabla 2, el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos circulatorios con la presencia de ácidos nucleicos con los de 1 a 200 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los ácidos nucleicos del receptor se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos nucleicos del donante se distinguen del receptor basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

La presente memoria descriptiva enseña además un procedimiento para determinar el estado de un riñón de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de ácidos nucleicos circulatorios en la muestra del receptor para determinar la presencia de polimorfismo de CNV seleccionado de entre un panel de polimorfismos tal como se indica en la Tabla 2 donde la presencia de ácidos nucleicos que no tienen el genotipo nulo para al menos una región de CNV en el panel indica que los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos del donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

La muestra biológica incluye un líquido corporal tal como plasma, sangre entera, suero, orina, pus, líquido respiratorio, líquido linfático, heces, bilis, saliva, esputo, semen, flujo vaginal, líquido cefalorraquídeo, líquido cerebral, ascitis, leche, secreciones de las vías genitourinarias y un lavado de un tejido u órgano (por ejemplo, a pulmón).

En una realización, la muestra es plasma sanguíneo.

En una realización, la CNV es una CND. En la Tabla 3 se indican ejemplos de CND.

60

La presente descripción enseña un procedimiento para determinar el estado de un tejido de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de una muestra de plasma sanguíneo del receptor para determinar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos que tienen un polimorfismo de CNV que incluye un polimorfismo de CND tal como un CND indicado en la Tabla 2 ó 3 que indica que son ácidos nucleicos del donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

Un ejemplo de un nivel aceptable de ácidos nucleicos del donante es un nivel que permite mantener la buena salud del paciente.

En la presente memoria descriptiva se enseña un procedimiento para determinar el estado de un tejido de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 200 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 200 polimorfismos de CNV conocidos tales como los CND indicados en la Tabla 2 ó 3, el cribado de un plasma sanguíneo del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos con la presencia de ácidos nucleicos con los de 1 a 200 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los ácidos nucleicos del receptor se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos nucleicos del donante se distinguen del receptor basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

La presente memoria descriptiva enseña además un procedimiento para determinar el estado de un tejido de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de ácidos nucleicos en plasma sanguíneo del receptor para determinar la presencia de polimorfismo de CNV tal como un polimorfismo de CND seleccionado de entre un panel de polimorfismos tal como se indica en la Tabla 2 ó 3 donde los ácidos nucleicos del receptor comprenden la presencia o ausencia de al menos un polimorfismo no compartido por el donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de apoptosis de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

En una realización, la presente descripción enseña un procedimiento para determinar el estado de un órgano de donante trasplantado en un receptor el donante órgano seleccionado de entre la lista que consiste en un riñón, un corazón, un pulmón, un islote pancreático, un hígado y un intestino, comprendiendo el procedimiento el cribado de un plasma sanguíneo del receptor para determinar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos que tienen un polimorfismo de CNV que indica que es del tejido trasplantado del donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

En una realización, la presente memoria descriptiva permite un procedimiento para determinar el estado de un órgano de donante trasplantado en un receptor el donante órgano seleccionado de entre la lista que consiste en un riñón, un corazón, un pulmón, un islote pancreático, un hígado y un intestino, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 200 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 200 polimorfismos de CNV conocidos, el cribado una muestra de plasma sanguíneo del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos con la presencia de ácidos nucleicos con los de 1 a 200 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los ácidos nucleicos del receptor se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos nucleicos del donante se distinguen del receptor basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

En una realización, la presente memoria descriptiva permite un procedimiento para determinar el estado de un órgano de donante trasplantado en un receptor el donante órgano seleccionado de entre la lista que consiste en un riñón, un corazón, un pulmón, un islote pancreático, un hígado y un intestino, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 100 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 100 polimorfismos de CNV conocidos, el cribado una muestra de plasma sanguíneo del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos con la presencia de ácidos nucleicos con los de 1 a 100 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los

ácidos nucleicos del receptor se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos nucleicos del donante se distinguen del receptor basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

En una realización, la presente memoria descriptiva permite un procedimiento para determinar el estado de un órgano de donante trasplantado en un receptor el donante órgano seleccionado de entre la lista que consiste en un riñón, un corazón, un pulmón, un islote pancreático, un hígado y un intestino, comprendiendo el procedimiento la selección de un panel de 1 a 10 pares de cebadores de oligonucleótidos que se dirigen a de 1 a 10 polimorfismos de CNV conocidos, el cribado una muestra de plasma sanguíneo del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos con la presencia de ácidos nucleicos con los de 1 a 10 pares de cebadores de oligonucleótidos donde los ácidos nucleicos del receptor se caracterizan por tener o no al menos uno de los polimorfismos de CNV conocidos a partir del panel y los ácidos nucleicos del donante se distinguen del receptor basándose en que tengan o no el polimorfismo compartido por el receptor, donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

Las CNV incluyen CND tales como las indicadas en la Tabla 2 según se ilustra en la Tabla 3.

La presente memoria descriptiva enseña además un procedimiento para determinar el estado de un órgano de donante trasplantado en un receptor, el donante órgano seleccionado de entre la lista que consiste en un riñón, un corazón, un pulmón, un islote pancreático, un hígado y un intestino, comprendiendo el procedimiento el cribado de ácidos nucleicos en muestra de plasma sanguíneo del receptor para determinar la presencia de polimorfismo de CNV seleccionado de entre un panel de polimorfismos seleccionado de entre la lista de la Tabla 2 donde los ácidos nucleicos del receptor comprenden la presencia o ausencia de al menos un polimorfismo no compartido por el donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

En una realización, el tejido es un órgano que es un riñón.

Por tanto, la presente descripción enseña un procedimiento para determinar el estado de un riñón de donante trasplantado en un receptor, comprendiendo el procedimiento el cribado de un plasma sanguíneo del receptor para determinar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos que tienen un polimorfismo de CNV seleccionado de entre la lista de la Tabla 2 que indica que son ácidos nucleicos del donante donde la presencia de ácidos nucleicos del donante es indicativa de daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de ácidos nucleicos del donante o un nivel de ácidos nucleicos del donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.

La extracción de muestras de sangre puede realizarse mediante cualquier técnica conocida en la técnica tal como mediante jeringa, dispositivo de aspiración al vacío, punción y similares. Una muestra de sangre puede tratarse o procesarse además de manera que se concentre la presencia de ácidos nucleicos para eliminar moléculas con alta abundancia, para reducir la coagulación, para reducir la trombólisis, para ajustar el pH o la osmolalidad o para estabilizar el líquido. La muestra de sangre, si se trata de forma apropiada, incluido su almacenamiento, puede mantenerse y someterse a ensayo desde menos de una hora a entre 24 horas y 2 semanas después de su recogida. Alternativamente, se somete a ensayo inmediatamente o en un periodo de 24 horas desde la recogida.

Los ácidos nucleicos son en general ADN genómico pero también pueden ser ARNm u otra especie de ARN. El ARN puede cribarse directamente o después de su conversión a ADN, por ejemplo ADNc.

En la presente memoria descriptiva se enseñan procedimientos y kits para el cribado sencillo de un paciente después de un procedimiento de trasplante. Se usa un panel de cebadores que detallan polimorfismos comunes de CNV. En la Tabla 2 se indica un ejemplo en relación con polimorfismos de CNV. En una realización, los receptores tienen el genotipo nulo (es decir, cero copias) para al menos un sitio de CND en el panel. La Tabla 3 es un ejemplo de un subconjunto de CND de las CNV indicadas en la Tabla 2.

El receptor puede expresar parte o la totalidad de los polimorfismos de CNV. No es necesario el genotipado del

donante con respecto a los polimorfismos de CNV ya que cualquier ácido nucleico que no sea un ácido nucleico del receptor se supone que es ácido nucleico del donante. El procedimiento contemplado en la presente memoria descriptiva proporciona un enfoque fiable para llevar un seguimiento del éxito o no de un procedimiento de trasplante y/o un procedimiento de tratamiento para mitigar el rechazo u otra forma de lesión en el tejido.

5

Convenientemente, el genotipo de CNV de ácidos nucleicos líquidos se determina mediante una reacción de amplificación, tal como PCR digital o en tiempo real seguida por electroforesis en gel, secuenciación de nucleótidos, expresión de moléculas reporteras (Gonzalez y col. (2005) *Environ. Microbiol.* 7(7):1024-1028; DeLa Vega y col. (2005) *Mutation Research* 573:111-135; Livak y col. (1995) *Nature Genetics* 9:341-342).

10

Las reacciones de amplificación útiles en la práctica del presente procedimiento incluyen PCR cuantitativa (q-PCR), PCR fluorescente cuantitativa (qf-PCR), PCR fluorescente múltiple (MF-PCR), PCR en tiempo real (RT-PCR), PCR de células individual, PCR de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), PCR-RFLP/RT-PCR-RFLP, PCR de inicio en caliente, PCR anidada, PCR *in situ*, amplificación de círculos rodantes *in situ*, PCR de puente, PCR de pivaloración y PCR de emulsión. Otros procedimientos de amplificación incluyen amplificación selectiva de secuencias de polinucleótidos diana, PCR cebada con secuencias de consenso (CP-PCR), PCR cebada arbitrariamente (AP-PCR), PCR de oligonucleótido-cebador degenerado (DOP-PCR) y amplificación de secuencias basadas en ácidos nucleicos (NABSA).

15

20 Después de la amplificación, el genotipo de CNV se determina por ejemplo por electroforesis que incluye capilar, zona capilar, enfoque isoeléctrico capilar y electroforesis en gel de capilar así como electrocromatografía capilar, cromatografía capilar electrocinética micelar y transitoria mediante el uso de matrices, perlas, cromatografía gaseosa, cromatografía de fluidos supercríticos, cromatografía líquida (que comprende partición, adsorción, intercambio de iones, exclusión de tamaño, cromatografía de capa fina y afinidad). Otras técnicas incluyen  
25 hibridación genómica comparativa, micromatrices, matrices de perlas y genotipado de alto rendimiento tal como con el uso de una sonda de inversión molecular.

En la presente memoria descriptiva se facilitan también reactivos y kits para cribado o cuantificación de ácidos nucleicos procedentes de un donante. Los reactivos y kits objeto pueden variar de forma y control. Los reactivos de  
30 interés incluyen reactivos diseñados específicamente para (i) genotipado de ácidos nucleicos a partir de un receptor; (ii) identificación de perfiles de marcadores; y (ii) detección y/o cuantificación de uno o más ácidos nucleicos a partir de un donante de trasplante en una muestra obtenida de un receptor de trasplante.

Un tipo de estos reactivos es una o más sondas o una matriz de sondas para el genotipado y/o la detección y/o la  
35 cuantificación de uno o más ácidos nucleicos. En la técnica se conoce una diversidad de diferentes formatos de matriz, con una amplia variedad de diferentes estructuras de sonda, composiciones de sustratos y tecnologías de fijación. En un ejemplo, los polimorfismos de CNV indicados en la Tabla 2 se someten a cribado mediante un panel de cebadores y/o sondas de oligonucleótido. En un ejemplo, los polimorfismos de CNV indicado en la Tabla 3 se someten a cribado mediante un panel de cebadores y/o sondas de oligonucleótidos.

40

Los kits de la presente memoria descriptiva pueden incluir matrices u otras plataformas de fase sólida. Dichos kits pueden comprender además uno o más agentes terapéuticos. El kit puede comprender además un paquete de software para análisis de datos, que puede incluir perfiles de referencia para comparación con el perfil de prueba.

45 Los kits pueden comprender reactivos tal como tampones y H<sub>2</sub>O u otros excipientes. Los kits pueden comprender reactivos necesarios para realizar extracción de ácidos nucleicos y/o detección de ácidos nucleicos usando los procedimientos descritos la presente memoria descriptiva tales como PCR y secuenciación.

Dichos kits pueden incluir también información, tal como referencias a bibliografía científica, materiales de  
50 prospectos de envases, resultados de pruebas diagnósticas y/o resúmenes de los mismos y similares, que indican o establecen las actividades y/o ventajas del ensayo de diagnóstico indicativo de la presencia de ácidos nucleicos del donante en una muestra corporal. Dichos kits también pueden incluir instrucciones para acceder a una base de datos. Dicha información puede incluir resultados de ensayos y controles predeterminados basados en ensayos de diagnóstico en seres humanos y animales. Los kits descritos en la presente memoria descriptiva pueden  
55 proporcionarse, comercializarse y/o promoverse entre los profesionales sanitarios, incluyendo médicos, profesionales de enfermería, farmacéuticos, responsables de medicamentos de formulario, y similares. En algunas realizaciones, los kits pueden comercializarse también directamente al consumidor. Esto último es útil especialmente en medicamentos de asistencia a domicilio y personalizados.

60 Cualquiera de los procedimientos anteriores puede ser realizado por un producto de programa informático que

- comprende una lógica ejecutable por ordenador que se graba en un medio legible por ordenador. Por ejemplo, el programa informático puede ejecutar parte o la totalidad de las funciones siguientes: (i) control del aislamiento de los ácidos nucleicos de una muestra, (ii) preamplificación de ácidos nucleicos de la muestra, (iii) amplificación, secuenciación u ordenación de regiones polimórficas específicas en la muestra, (iv) identificación y cuantificación de un perfil de marcadores de CNV en la muestra, (v) comparación de datos en el perfil de marcadores de CNV detectado a partir de la muestra con un umbral predeterminado, (vi) determinación del estado o resultado del trasplante, (vi) declaración de un estado o resultado del trasplante normal o anómalo. En una realización, la lógica ejecutable por ordenador puede analizar los datos sobre la detección y cantidad de polimorfismos de CNV.
- 10 La lógica ejecutable por ordenador puede funcionar en cualquier ordenador que puede ser cualquiera de diversos tipos de ordenadores de uso genérico tales como un ordenador personal, un servidor en red, una estación de trabajo u otra plataforma informática que incluye dispositivos manuales y portátiles. En una realización, se describe un producto de programa informático que comprende un medio utilizable por ordenador que tiene la lógica ejecutable por ordenador (programa de software informático, que incluye código de programa) almacenada en el mismo.
- 15 La lógica ejecutable por ordenador puede ser ejecutada por un procesador, para hacer que el procesador ejecute las funciones descritas en la presente memoria descriptiva. En otra realización, algunas funciones se implementan principalmente en hardware usando, por ejemplo, una máquina de estado de hardware. La implementación de la máquina de estado de hardware que ejecuta las funciones descritas en la presente memoria descriptiva será evidente para los expertos en la materia.
- 20 El programa puede proporcionar un procedimiento para evaluar un estado o resultado del trasplante en el receptor de un trasplante accediendo a datos que reflejan el genotipado del receptor del trasplante y/o la presencia o ausencia de uno o más ácidos nucleicos del donante del trasplante en la circulación del paciente de trasplante después del trasplante.
- 25 En una realización, el ordenador que ejecuta la lógica informática descrita en la presente memoria descriptiva también puede incluir un dispositivo de entrada digital tal como un escáner. El dispositivo de entrada digital puede proporcionar información sobre un ácido nucleico, por ejemplo presencia o cantidad de CNV (por ejemplo, CNV). Por ejemplo, un escáner descrito en la presente memoria descriptiva puede proporcionar una imagen de la CNV (por ejemplo, CNV) de acuerdo con el procedimiento de ensayo objeto. Por ejemplo, un escáner puede proporcionar una imagen detectando una emisión fluorescente, radiactiva u otra; detectando radiación emitida, reflejada o dispersada; detectando propiedades electromagnéticas u otras características; o por otras técnicas. Los datos detectados se almacenan normalmente en un dispositivo de memoria en forma de un archivo de datos. En una realización, un escáner puede identificar uno o más objetos etiquetados. Por ejemplo, puede etiquetarse un primer polimorfismo de CNV con un primer colorante que experimenta fluorescencia para una frecuencia característica en particular, o una banda estrecha de frecuencias, en respuesta a una fuente de excitación de una frecuencia en particular. Puede etiquetarse un segundo polimorfismo de CNV con un segundo colorante que experimenta fluorescencia en una frecuencia característica diferente. Las fuentes de excitación para el segundo colorante pueden tener, aunque no necesariamente, una frecuencia de excitación diferente a la fuente que excita el primer colorante, por ejemplo, las fuentes de excitación podrían ser los mismos láseres o láseres diferentes.
- 30 En una realización, la descripción objeto enseña un medio legible por ordenador que comprende un conjunto de instrucciones grabadas en el mismo que hacen que un ordenador ejecute las etapas de (i) recepción de los datos de uno o más ácidos nucleicos detectados en una muestra de un sujeto que ha recibido un trasplante de un donante, donde el uno o más ácidos nucleicos son ácidos nucleicos no del receptor (es decir, el uno o más ácidos nucleicos son del trasplante del donante) y donde el uno o más ácidos nucleicos del donante se identifican basándose en un perfil de marcadores de CNV predeterminado (por ejemplo, perfil de CNV indicado en la Tabla 2); y (ii) diagnóstico o predicción del estado o resultado del trasplante basándose en la presencia o ausencia del uno o más ácidos nucleicos.
- 35 La presente descripción permite además un protocolo de trasplante para trasplantar tejido de un donante a un receptor, comprendiendo el protocolo el trasplante del tejido y después el seguimiento de una muestra del receptor para determinar la presencia de ácidos nucleicos que no son del receptor donde si se detectan ácidos nucleicos del donante, el receptor se somete a terapia de inmunosupresión o si el paciente está en terapia de inmunosupresión, se modifica la terapia.
- 40 Otro aspecto en la presente memoria descriptiva enseña el uso de un panel de CNV que identifican un ácido nucleico como de origen de un receptor o no de origen de un receptor en la preparación de un ensayo de diagnóstico para detectar el estado de un tejido trasplantado en el receptor.
- 45
- 50
- 55
- 60



La descripción objeto enseña además un ensayo para llevar un seguimiento del equilibrio entre la inmunosupresión y el daño en el tejido tal como el debido a un rechazo o a citotoxicidad farmacéutica. Por tanto, la descripción objeto enseña un procedimiento de tratamiento de un sujeto que se ha sometido a un procedimiento de trasplante mediante el seguimiento de los cambios en los niveles de ácidos nucleicos no del receptor. Dichos cambios pueden realizarse con respecto a un control. El control incluye los niveles anteriores a un trasplante de ácidos nucleicos libres del receptor o a un cambio en la proporción entre ácidos nucleicos totales y ácidos nucleicos no del receptor.

Mientras la Tabla 2 proporciona una lista de polimorfismos de CNV, el presente procedimiento se extiende a otros polimorfismos de CNV conocidos tales como los descritos por Conrad y col. (2010) ver más arriba y McCarroll y col. (2008) ver más arriba.

Los aspectos contemplados en la presente memoria descriptiva se describen adicionalmente por medio de los siguientes Ejemplos no limitativos.

**15 EJEMPLO 1**

**Desarrollo de un panel de genotipado de deleciones de CNV para distinguir el ADN en plasma del receptor y el donante**

Se selecciona un panel de deleciones de CNV de las que se espera que tengan frecuencias nulas aproximadas del 40-50% en la población general. Esto se realiza mediante análisis *in silico* datos públicos (Conrad y col. (2010) ver más arriba; McCarroll y col. (2008) ver más arriba). Estas regiones de CNV son polimórficas y no tienen significación clínica intrínseca. La selección de CNV y los cálculos de frecuencias se realizan del modo siguiente: El conjunto de datos HapMap incluye función trio-data para cada CNV. Para los cálculos de frecuencias, se incluyen sólo muestras singleton y parentales. Para el análisis se seleccionan las CNV con sólo genotipos de 0, 1 y 2 copias (es decir, se excluyen las CNV de más de 2 copias y CNV de cromosomas X e Y). Para cada CNV seleccionada, se calculan las frecuencias de los genotipos de 0, 1 y 2 copias. Se excluyeron las CNV en forma de CNV con solapamiento con duplicaciones de segmentos. De la Tabla 2 se seleccionaron las CNV con frecuencia de 0,4-0,5 copias nulas y menos de 3 kb de. La lista de la Tabla 2 debe leerse conjuntamente con, e incluye, otras CNV conocidas tales como las definidas en Conrad y col. (2010) ver más arriba; McCarroll y col. (2008) ver más arriba. Un ejemplo es el de las CNV indicadas en la Tabla 3.

**Tabla 2**

<b>Polimorfismos de variantes del número de copias</b>							
<b>ID CNP</b>	<b>Chr</b>	<b>Inicio (hg18)</b>	<b>Fin (hg 18)</b>	<b>Tamaño (pb)</b>	<b>Frecuencia 0 copias</b>	<b>Frecuencia 1 copia</b>	<b>Frecuencia 2 copias</b>
CNVR358.1	chr1	150.822.234	150.856.715	34.481	0,393	0,459	0,148
CNVR217.1	chr1	72.538.870	72.584.557	45.687	0,393	0,459	0,148
CNVR483.1	chr1	205.359.125	205.359.831	706	0,459	0,426	0,115
CNVR451_full	chr1	192.716.897	192.721.360	4.463	0,459	0,418	0,107
CNVR376.1	chr1	157.134.152	157.136.674	2.522	0,508	0,418	0,074
CNVR381.1	chr1	157.915.386	157.916.253	867	0,582	0,344	0,049
88	chr1	110.025.907	110.044.476	18.569	0,583	0,350	0,067
CNVR431.1	chr1	185.731.458	185.733.106	1.648	0,598	0,320	0,041
262	chr2	97.507.179	97.528.142	20.963	0,367	0,450	0,167
CNVR1138.2	chr2	219.761.436	219.762.572	1.136	0,385	0,410	0,180
CNVR1138.3	chr2	219.760.351	219.762.572	2.221	0,385	0,418	0,164
CNVR966.1	chr2	126.159.644	126.168.438	8.794	0,393	0,418	0,164
CNVR1037.1	chr2	159.668.040	159.669.209	1.169	0,492	0,418	0,066
CNVR952.1	chr2	121.513.996	121.515.257	1.261	0,516	0,352	0,098
CNVR801_full	chr2	54.419.132	54.420.976	1.844	0,574	0,361	0,041
CNVR842.1	chr2	76.627.234	76.628.943	1.709	0,582	0,320	0,074
CNVR1041_full	chr2	162.039.479	162.042.198	2.719	0,672	0,270	0,033
CNVR1058.1	chr2	176.973.956	176.980.168	6.212	0,672	0,254	0,049
CNVR894.2	chr2	101.419.843	101.420.750	907	0,680	0,180	0,008
CNVR1648.2	chr3	180.032.900	180.033.574	674	0,352	0,492	0,156
CNVR1438_full	chr3	80.144.512	80.147.226	2.714	0,377	0,484	0,139
CNVR1576.1	chr3	147.867.879	147.873.031	5.152	0,426	0,459	0,115
CNVR1419.1	chr3	68.822.189	68.830.557	8.368	0,426	0,393	0,180

ES 2 646 212 T3

CNVR1685.1	chr3	194.358.041	194.368.093	10.052	0,443	0,443	0,115
CNVR1610.1	chr3	164.247.638	164.251.756	4.118	0,508	0,426	0,066
CNVR1341.1	chr3	32.077.088	32.082.966	5.878	0,516	0,361	0,107
CNVR1464.1	chr3	100.381.786	100.385.095	3.309	0,656	0,295	0,041
CNVR2196.1	chr4	182.293.552	182.294.187	635	0,352	0,443	0,148
CNVR1894.1	chr4	39.701.722	39.702.524	802	0,361	0,516	0,123
CNVR2221_full	chr4	187.330.507	157.348.434	17.927	0,361	0,492	0,123
CNVR1937.1	chr4	61.621.762	61.624.843	3.081	0,369	0,525	0,107
CNVR1935_full	chr4	61.012.725	61.017.305	4.580	0,492	0,434	0,074
CNVR1819.6	chr4	9.783.252	9.843.664	60.412	0,508	0,410	0,082
CNVR2172_full	chr4	173.661.594	173.670.645	9.051	0,525	0,434	0,016
CNVR2168_full	chr4	172.610.978	172.616.208	5.230	0,557	0,361	0,025
726	chr4	173.661.522	173.665.218	3.696	0,567	0,350	0,067
CNVR2613_full	chr5	135.143.151	135.148.760	5.609	0,377	0,484	0,139
CNVR2535_full	chr5	98.373.056	98.375.260	2.204	0,402	0,410	0,189
CNVR2344_full	chr5	10.326.006	10.327.951	1.945	0,467	0,385	0,115
CNVR2469.1	chr5	57.359.283	57.369.499	10.216	0,615	0,361	0,025
CNVR2304.1	chr5	1.977.604	1.978.111	507	0,672	0,328	0,000
896	chr5	177.160.157	177.165.211	5.054	0,683	0,300	0,017
CNVR2939.3	chr6	65.405.092	65.405.828	736	0,369	0,426	0,139
CNVR2939.2	chr6	65.401.412	65.406.139	4.727	0,369	0,475	0,156
CNV2799.1	chr6	18.510.098	18.510.860	761	0,393	0,426	0,148
CNVR3004.1	chr6	95.250.114	95.251.113	999	0,393	0,459	0,123
CNVR2906.1	chr6	54.036.723	54.042.793	6.070	0,451	0,475	0,066
CNVR2972_full	chr6	77.154.212	77.160.412	6.200	0,459	0,443	0,090
CNVR2859_full	chr6	35.734.415	35.737.723	3.308	0,467	0,443	0,082
933	chr6	32.539.530	32.681.749	142.219	0,550	0,383	0,067
CNVR3009.1	chr6	100.141.275	100.141.994	719	0,623	0,377	0,000
CNVR3472_full	chr7	81.279.416	81.280.521	1.105	0,377	0,467	0,156
CNVR3319.1	chr7	24.004.755	24.006.584	1.829	0,434	0,344	0,139
CNVR3495.1	chr7	93.379.735	93.380.461	726	0,443	0,410	0,148
1103	chr7	70.058.925	70.064.077	5.152	0,450	0,483	0,067
CNVR3451.1	chr7	73.467.042	73.469.172	2.130	0,549	0,328	0,123
CNVR3609.1	chr7	147.704.059	147.707.263	3.204	0,656	0,311	0,033
CNVR3753_full	chr8	4.110.308	4.112.335	2.027	0,426	0,426	0,131
CNVR3935.1	chr8	75.525.410	75.529.549	4.139	0,451	0,369	0,172
CNVR4014.1	chr8	112.363.260	112.365.469	2.209	0,500	0,410	0,082
CNVR3831.1	chr8	25.122.647	25.126.577	3.930	0,598	0,328	0,049
CNVR3689.1	chr8	584.449	589.454	5.005	0,689	0,262	0,041
CNVR4250.1	chr9	36.352.611	36.353.818	1.207	0,369	0,508	0,115
CNVR4331.1	chr9	70.927.946	70.933.190	5.244	0,443	0,467	0,082
CNVR4374.1	Chr9	88.344.772	88.345.596	824	0,557	0,361	0,074
CNVR4203.1	chr9	17.900.038	17.901.633	1.595	0,598	0,352	0,025
CNVR4332.1	chr9	71.085.050	71.086.301	1.251	0,631	0,328	0,025
CNVR4841.1	chr10	89.265.522	89.266.538	1.016	0,377	0,459	0,156
CNVR4665.1	chr10	27.039.121	27.041.860	2.739	0,377	0,410	0,213
CNVR4886.1	chr10	108.020.303	108.022.518	2.215	0,410	0,418	0,172
CNVR4596.1	chr10	4.698.559	4.700.493	1.934	0,607	0,311	0,082
CNVR4906.1	chr10	122.216.913	122.218.702	1.789	0,664	0,270	0,057
1730	chr11	54.458.221	54.514.519	56.298	0,433	0,367	0,100
CNVR5122.1	chr11	28.963.726	28.969.302	5.576	0,434	0,434	0,115
CNVR5294.1	chr11	103.772.866	103.778.468	5.602	0,475	0,369	0,148
CNVR5429.1	chr12	9.524.006	9.626.453	102.447	0,393	0,402	0,139
CNVR5853_full	chr13	38.831.627	38.833.387	1.760	0,385	0,451	0,148
CNVR5923.1	chr13	71.743.783	71.744.892	1.109	0,402	0,533	0,041
CNVR5850.1	chr13	37.955.318	37.958.191	2.873	0,426	0,434	0,139
CNVR5871.1	chr13	49.967.347	49.973.131	5.784	0,590	0,361	0,033

ES 2 646 212 T3

CNVR6133.1	chr14	39.679.595	39.687.469	7.874	0,352	0,475	0,156
CNVR6211.1	chr14	81.568.879	81.573.106	4.227	0,385	0,377	0,189
CNVR6084.1	chr14	21.951.540	21.952.070	530	0,451	0,418	0,107
CNVR6074_full	chr14	19.621.390	19.625.018	3.628	0,582	0,344	0,057
CNVR6357.1	chr15	37.531.690	37.532.136	446	0,508	0,410	0,066
CNVR6540,1	chr15	97.392.250	97.392.985	735	0,508	0,426	0,057
CNVR6670,1	chr16	22.955.370	22.957.061	1.691	0,377	0,525	0,074
CNVR6676.1	chr16	25.247.611	25.250.595	2.984	0,443	0,459	0,074
CNVR6782.1	chr16	75.096.634	75.101.530	4.896	0,443	0,443	0,098
CNVR7144.1	chr17	53.042.845	53.044.836	1.991	0,410	0,434	0,148
CNVR7096.1	chr17	36.675.163	36.685.731	10.568	0,484	0,402	0,107
CNVR7301.1	chr18	33.560.073	33.560.645	572	0,418	0,451	0,123
CNVR7344.1	chr18	53.097.735	53.099.702	1.967	0,508	0,393	0,082
CNVR7543.1	chr19	12.555.939	12.559.475	3.536	0,475	0,402	0,057
CNVR7581_full	chr19	22.932.698	22.934.767	2.069	0,648	0,270	0,025
2434	chr19	58.210.563	58.244.245	33.682	0,683	0,233	0,067
2454	chr20	1.509.580	1.541.893	32.313	0,483	0,467	0,050
CNVR7808.1	chr20	21.234.267	21.236.529	2.262	0,516	0,418	0,066
CNVR7849.1	chr20	41.705.581	41.707.310	1.729	0,664	0,311	0,008
CNVR7796_full	chr20	15.657.506	15.660.363	2.857	0,672	0,279	0,033
2559	chr22	22.613.016	22.670.785	57.769	0,383	0,467	0,150
CNVR8147.1	chr22	33.975.445	33.976.472	1.027	0,451	0,426	0,115
CNVR8114.4	chr22	22.604.143	22.607.619	3.476	0,451	0,434	0,107
CNVR8154.1	chr22	35.473.303	35.476.957	3654	0,566	0,352	0,074

Tabla 3

Polimorfismos de delección del número de copias									
CND_ID	CNP_id	chr	inicio_hg18	fin_hg18	TAMAÑO pb	Frecuencia 0 copias	Frecuencia 1 copia	Frecuencia 2 copias	Info CNV
CND_01	CNVR376.1	chr1	157.134.152	157.136.674	2.522	0,508	0,418	0,074	agénico
CND_02	CNVR7344.1	chr18	53.097.735	53.099.702	1.967	0,508	0,393	0,082	agénico
CND_03	CNVR4014.1	chr8	112.363.260	112.365.469	2.209	0,500	0,410	0,082	agénico
CND_04	CNVR6084.1	chr14	21.951.540	21.952.070	530	0,451	0,418	0,107	Intrónico
CND_05	CNVR6676.1	chr16	25.247.611	25.250.595	2.984	0,443	0,459	0,074	agénico
CND_06	CNVR3319.1	chr7	24.004.755	24.006.584	1.829	0,434	0,344	0,139	agénico
CND_07	CNVR5850.1	chr13	37.955.318	37.958.191	2.873	0,426	0,434	0,139	agénico
CND_08	CNVR3753_full	chr8	4.110.308	4.112.335	2.027	0,426	0,426	0,131	Intrónico
CND_09	CNVR7301.1	chr18	33.560.073	33.560.645	572	0,418	0,451	0,123	agénico
CND_10	CNVR4886.1	chr10	108.020.303	108.022.518	2.215	0,410	0,418	0,172	agénico

**EJEMPLO 2*****Genotipado de receptores usando ensayos de PCR simple con ADN procedente de células***

5 Las reacciones de PCR se diseñan con cebadores situados en las 10 regiones de delección de CNV proporcionadas en la Tabla 3 (Ejemplo 1) para confirmar las frecuencias nulas esperadas (es decir, sin producto de PCR) usando ADN genómico de un grupo de 21 personas normales. La Figura 1a muestra la confirmación de la frecuencia predicha del 40-50% para CND\_01, es decir 12 de 21 genotipos nulos. Para confirmar que las delecciones son reales y no artefactos de fallo de la PCR, las reacciones de PCR se realizan con cebadores de flanco. Los resultados se muestran para CND\_01 (Figura 1b). Estos resultados proporcionan un producto preciso más corto que el natural lo que confirma todas las delecciones nulas detectadas en (a), siendo el resto heterocigotos nulos/naturales con la excepción de dos (con flechas) que son homocigotos naturales (nota: el producto natural más grande está ausente ya que la CNV sin delección es demasiado grande para ser amplificada).

**15 EJEMPLO 3*****Validación de las PCR de genotipado***

20 La identidad de los productos de PCR interna se demuestra inequívocamente mediante la secuenciación de los productos flanqueantes de PCR más cortos correspondientes y su cartografiado de nuevo en la localización en el genoma usando BLAT. En todos los casos, era el locus genómico único correcto.

Una ventaja de este enfoque es que no es necesario el genotipado del donante. El genotipo del receptor se determina usando el componente de células de leucocitos de la misma muestra de sangre anticoagulada a partir de la cual se obtiene el plasma. El ensayo detecta regiones de CNV no propias, es decir, específicas del donante, en el plasma.

**EJEMPLO 4****30 *Genotipado de delección de CNV usando ADN derivado del plasma***

Se muestra el genotipado de delección de CNV (CND) usando ADN de plasma. A diferencia del ADN derivado de células, el ADN de plasma es degradado en fragmentos cortos de 400-600 pb. La Figura 2 muestra un genotipado de delección de CNV totalmente concordante para 4 personas (3 heterocigotos/o homocigotos y 1 nulo) usando ADN de leucocitos y ADN de plasma de las mismas muestras de sangre, en este caso para CND\_02 mediante PCR.

**EJEMPLO 5*****Optimización del panel de detección de CNV (100-150 personas)***

40 Con el fin de optimizar el panel de delección de CNV para su uso en la población local, es necesario determinar con precisión las frecuencias nulas en un conjunto más grande de muestras de ADN genómico (de aproximadamente 100-150 personas) teniendo en cuenta las diferencias basadas en la etnia. El carácter informativo del panel final es probablemente del 100% para cualquier receptor. Para receptores muy raros que no tienen genotipos 'nulos' en el panel, pueden usarse ensayos alternativos diseñados a medida basándose en los genotipos 'nulos' en el donante. 45 En trasplante clínico existe un bajo nivel de microquimerismo con células dendríticas del donante, en particular. No se prevé que el bajo nivel de células contaminantes interfiera con el establecimiento del perfil de ADN del donante, ya que no se realizará con alta sensibilidad.

**50 EJEMPLO 6*****Sensibilidad de PCR de genotipado de delección de CNV usando ADN de plasma***

55 Se ha obtenido una indicación de la sensibilidad que puede conseguirse usando PCR simple por medio de un experimento de 'picos'. Dada una muestra de control que es heterocigótica (es decir, 1 copia) para los loci CND\_01 se obtiene un 'pico' en una muestra nulisómica en proporciones del 0-100% y se analiza en un ensayo de PCR simple. Los resultados de la Figura 3 muestran que CND\_01 podría detectarse en proporciones de apenas el 1% (con flecha). Además, se desarrollan ensayos de q-PCR que tienen sensibilidades un orden de magnitud más sensibles que el 1%.

60

**EJEMPLO 7*****Desarrollo de ensayos de PCR cuantitativa (q-PCR) para las CNV del donante (10 ensayos)***

5 Se desarrolla un ensayo de q-PCR específico para cada región de CNV en el panel de delección de CNV para la cuantificación absoluta de concentraciones de CNV en plasma. Así se proporciona una detección muy sensible de secuencias de ADN del donante que se corresponden con delecciones de CNV del receptor. Un ensayo de q-PCR análoga para cuantificación sensible de SRY en muestras de plasma de receptores de mujer con un trasplante de órganos de un donante masculino (Figura 4). Este es un sistema de modelo para cada una de las regiones de CNV del panel. La q-PCR se realiza esencialmente tal como se ha descrito anteriormente (Lo y col. (1998) Am J Hum Genet 62(4):768-75). Demuestra la viabilidad de adoptar este enfoque para la cuantificación de niveles bajos de secuencias específicas del donante de ADN en el plasma del receptor.

15 Como se someten a ensayo mediante q-PCR cantidades muy bajas de ADN, existe un riesgo de contaminación con ADN de otras fuentes (operador o muestras). Las múltiples delecciones de CNV informativas que se someten a ensayo para cada par de receptor-donante proporcionan un indicador valioso de posibles inconsistencias en los resultados de ensayos individuales. Un requisito adicional es que se incluyan controles 'no de plantilla' en cada experimento de qPCR.

**EJEMPLO 8*****Sensibilidad de ensayos de qPCR que usan ADN genómico***

25 La sensibilidad de los ensayos de qPCR para la medida de una especie de ADN rara en una mezcla de ADN se determinó usando experimentos de 'picos'. Para cada ensayo de qPCR en el panel, se obtiene un 'pico' para una muestra control que es heterocigótica (es decir, 1 copia) para el locus de CND respectivo en una muestra nulisómica en un intervalo (20-500) de copias haploides (es decir, equivalentes genómicos por reacción). Los resultados de las Figuras 5a, b, c para CND01, CND02 y CND03 muestran respectivamente que los ensayos de qPCR generan medidas exactas, precisas y robustas del nivel de ADN raro en la mezcla de hasta un 20 GE por reacción.

30

**EJEMPLO 9*****Detección de ADN de donante (no propio) en muestras de plasma de un receptor de trasplante de riñón***

35 Se recoge una muestra de sangre de un paciente que manifiesta rechazo clínico. Se prepara ADN de fracciones de leucocitos y plasma y se realizan ensayos de PCR específicos para cada uno del panel de 10 delecciones de CNV. El ADN de leucocitos (propio) es 'nulo' para CND\_02, CND\_03 y CND\_08 (Figura 6). Se encuentran productos de PCR no propios (procedentes de trasplante) en el ADN en plasma para CND\_03 y CND\_08. No se encuentra producto de plasma para CND\_02 ya que el donante del órgano era presumiblemente también 'nulo' para esta delección de CNV (la probabilidad de que suceda es de 1 sobre 2 [50%]).

45 Los productos de PCR CND\_03 y CND\_08 PCR del plasma se secuenciaron y mediante BLAT mostraron una correspondencia exacta con las secuencias genómicas respectivas esperadas que revelan que son únicos y no propios en origen.

**EJEMPLO 10*****Estudios clínicos***

50 Todos los receptores se someten primero a genotipado para determinar el estado del genotipo para todas las CNV del panel. Los marcadores de CNV donde el receptor es heterocigoto para la secuencia natural se usan para el ensayo de las concentraciones plasmáticas totales de ADN propio (también se usa para este fin un ensayo qPCR HBB independiente). Se usan los marcadores de CNV donde el receptor es 'nulo' y el donante no lo es para determinar las concentraciones plasmáticas de ADN específicas del donante en el plasma del receptor. El ADN total del plasma del receptor y el ADN del plasma específico del donante se midieron en 35 receptores de trasplante, incluidos 26 receptores de trasplante estables, 6 receptores de trasplante que mostraban signos clínicos variables de rechazo de los que dos mostraron niveles muy elevados de ADN de donante circulante (AUS\_01 y ORG\_01) y 3 receptores de trasplante que experimentaron otras complicaciones (ORG\_03, ORG\_25 y ORG\_31). En las Figuras 7a y 7b se muestran las medidas de ADNcf en plasma procedente del trasplante y el ADNcf total en plasma para las 60 35 muestras. En los seis receptores de trasplante que experimentaron signos clínicos variables de rechazo, se

encontró que las concentraciones en plasma de ADN específico del donante variaban, lo cual parecía tener correlación con el mecanismo inmunológico de rechazo (es decir, de mediación humoral frente a celular) así como la categoría médica del rechazo (es decir, aguda frente a crónica).

5 **EJEMPLO 11**

***Investigaciones longitudinales en una muestra individual***

Se realizaron ensayos de qPCR informáticos en muestras tomadas de un receptor de trasplante en los siguientes instantes de tiempo: antes del trasplante, semanalmente para 4 semanas después del trasplante, a 12 semanas y a 24 semanas. Las medidas de ADNcf en plasma procedente del trasplante y de ADNcf total en plasma se muestran en las Figuras 8a y 8b.

Los expertos en la materia observarán que la descripción descrita en la presente memoria descriptiva es susceptible de variaciones y modificaciones diferentes a las descritas específicamente. Debe entenderse que la descripción contempla todas estas variaciones y modificaciones. La descripción permite también todas las etapas, características, composiciones y compuestos que se refieren o se indican en la presente memoria descriptiva, De forma individual o colectiva, y todas y cada una de las combinaciones de dos cualesquiera o más de las etapas o características o composiciones o compuestos.

20

**BIBLIOGRAFÍA**

- Cass et al. (2010) *Kidney Health Australia* 27  
 Conrad et al. (2010) *Nature* 464:704-712  
 25 DeLa Vega et al. (2005) *Mutation Research* 573:111-135  
 Diehl et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 102:16368-16373  
 Diehl et al. (2008) *Nat. Med.* 14:985-990  
 Feuk et al. (2006) *Nature Rev* 7:85-97  
 Giacona et al. (1998) *Pancreas* 17:89-97  
 30 Gonzalez et al. (2005) *Environ. Microbiol.* 7(7):1024-1028  
 Howard et al. (2009) *Nephrology* 14:123-132  
 Lee et al. (2006) *Transfusion* 46:1870-1878  
 Livak et al. (1995) *Nature Genetics* 9:341-342  
 Lo et al. (1998) *Am J Hum Genet* 62(4):768-75  
 35 McCarroll et al. (2008) *Nat Genet* 40(10):1166-1174  
 Mandel et al. (1948) *C.R. Acad. Sci Paris* 142:241-243  
 The 1000 Genomes Project Consortium (2010) *Nature* 467:1061-1073  
 Weber et al. (2002) *Am J Human Genet* 71:854-862  
 40 Wu et al. (2009) *Nature Medicine* 15(2):215-219

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento *in vitro* para determinar el estado de un tejido de donante implantado en un receptor, comprendiendo dicho procedimiento el cribado de una muestra del receptor para determinar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos circulatorios que tienen un polimorfismo de variación en el número de copias (CNV) que indica que son ácidos nucleicos procedentes de un donante, donde la presencia de dichos ácidos nucleicos circulatorios de donante es indicativa de un daño celular del tejido trasplantado y la ausencia de dichos ácidos nucleicos circulatorios de donante o un nivel de dichos ácidos nucleicos circulatorios de donante con respecto a un control es indicativa de ausencia de daño celular o de un daño celular en un nivel aceptable.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 donde los ácidos nucleicos en la muestra se someten a ensayo en relación con una CNV a partir de un panel de sitios de CNV donde un receptor o donante dado se **caracteriza por** ser nulisómico para al menos uno de los sitios de CNV y el otro entre el receptor o el donante no lo es, donde preferentemente el sitio de CNV se selecciona de entre la lista indicada en la Tabla 2.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 donde la presencia de la CNV no se determina por análisis de secuencia de nucleótidos o análisis de microquimerismo bialélico.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3 donde la CNV es un polimorfismo de delección de número de copias (CND).
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 donde el sitio de CND se selecciona de entre la lista indicada en la Tabla 3 donde el receptor se **caracteriza por** tener un genotipo nulo para al menos un sitio de CND.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el tejido trasplantado es un órgano seleccionado de entre la lista que consiste en un riñón, un corazón, un pulmón, un islote pancreático, un hígado, un intestino y la piel.
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el tejido trasplantado es una extremidad seleccionada de entre la lista que consiste en una pierna, un brazo, una mano y un pie.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el tejido trasplantado es un apéndice seleccionado de entre la lista que consiste en un dedo del pie, una nariz y una oreja.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el tejido es microtejido o células madre
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el tejido trasplantado es un riñón.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde la muestra se selecciona de entre la lista que consiste en plasma, sangre entera, suero, orina, pus, líquido respiratorio, líquido linfático, heces, bilis, saliva, esputo, semen, flujo vaginal, líquido cefalorraquídeo, líquido cerebral, ascitis, leche, secreciones de las vías genitourinarias y un lavado de un tejido u órgano.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 donde la muestra es plasma, sangre entera o suero.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 donde la muestra es orina.
14. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde si se detectan ácidos nucleicos del donante, el receptor debe someterse a terapia de inmunosupresión o si el paciente está en terapia de inmunosupresión, la terapia debe modificarse.
15. Uso de un panel de CNV que identifica un ácido nucleico circulatorio como de origen de un receptor o de origen de un donante en un ensayo de diagnóstico *in vitro* para detectar el estado de daño celular del tejido trasplantado en el receptor, donde preferentemente el panel de CNV es tal como se indica en la Tabla 2, donde preferentemente la CNV es una CND, donde preferentemente la CND se selecciona de entre la lista indicada en la



Tabla 3, donde el receptor se **caracteriza por** tener un genotipo nulo para al menos un sitio de CND.

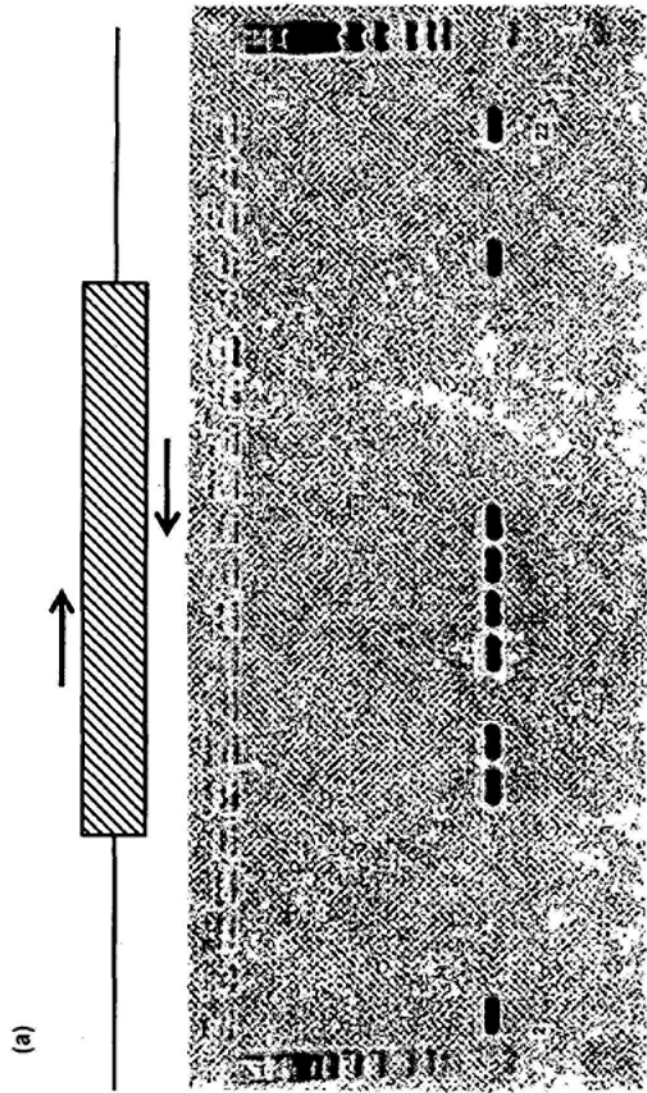


Figura 1a

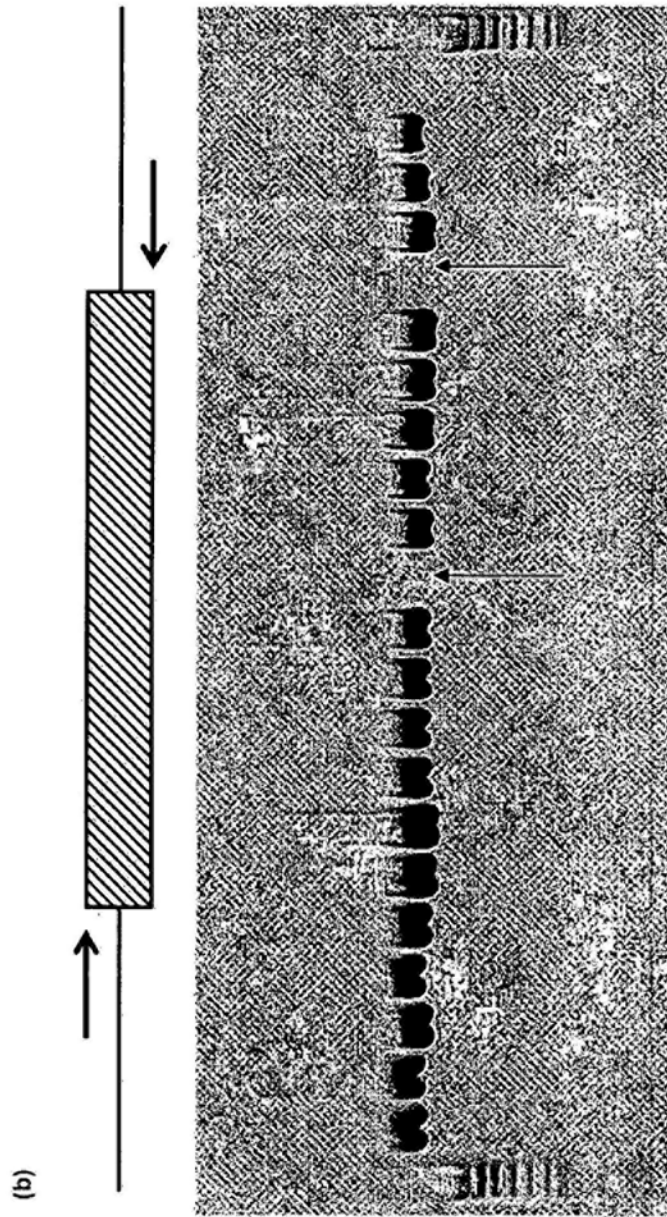


Figura 1b

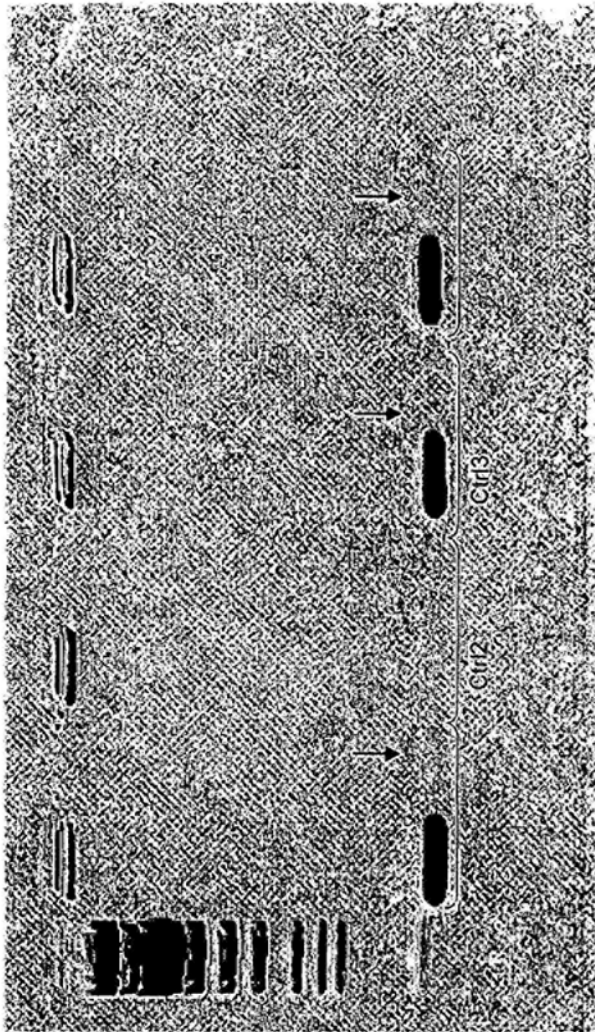


Figura 2

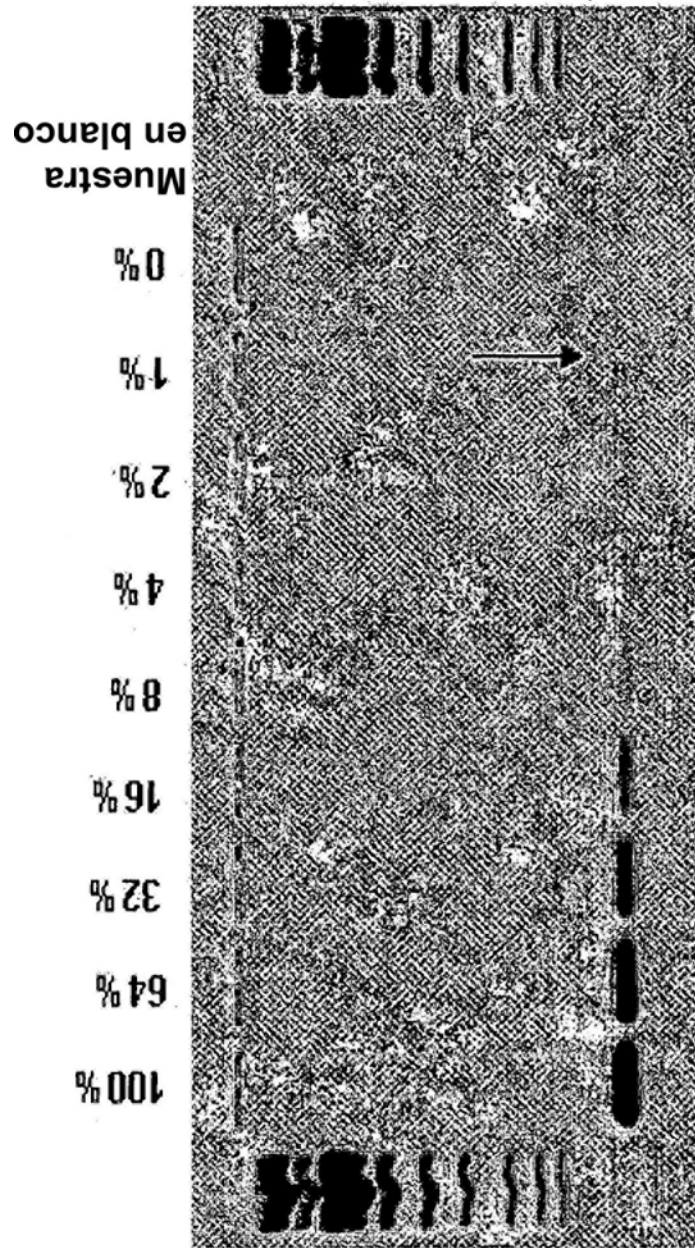


Figura 3

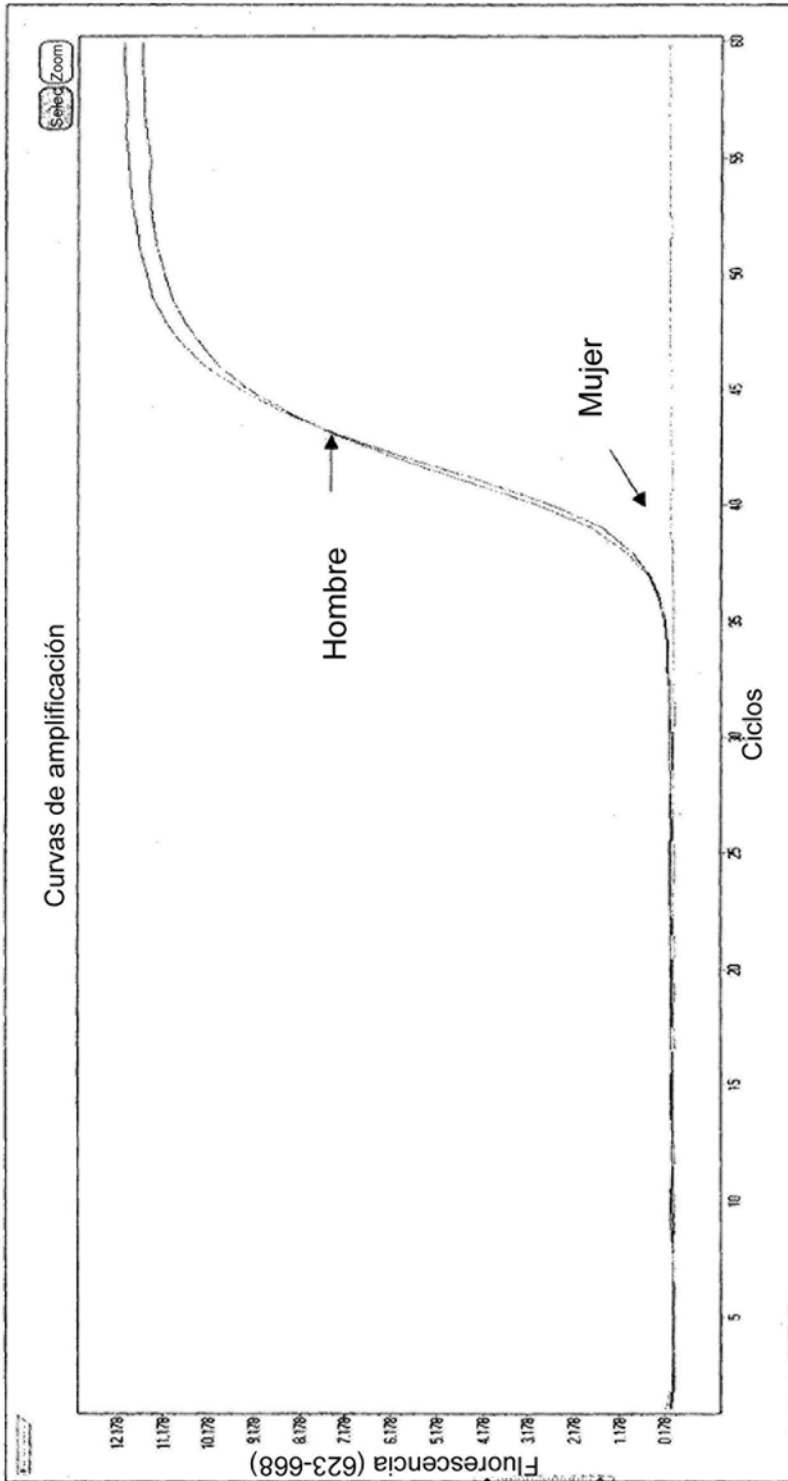


Figura 4

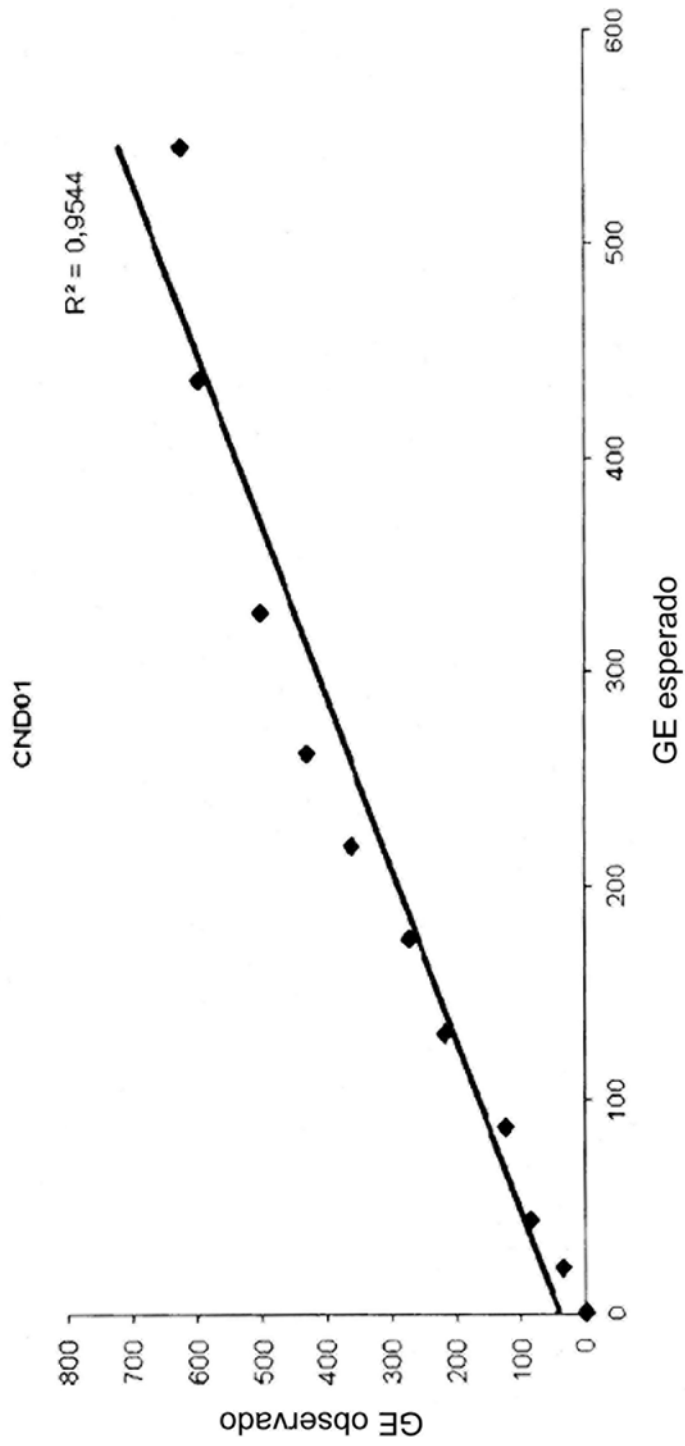


Figura 5a

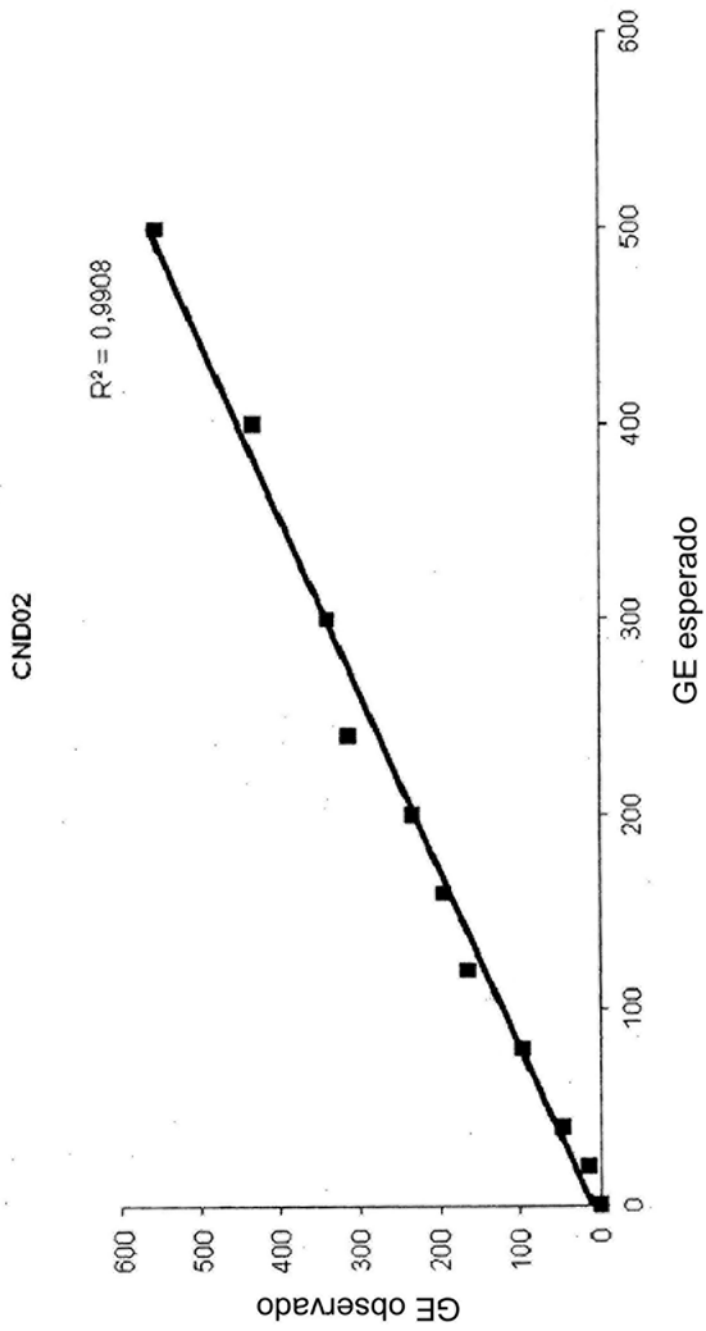


Figura 5b



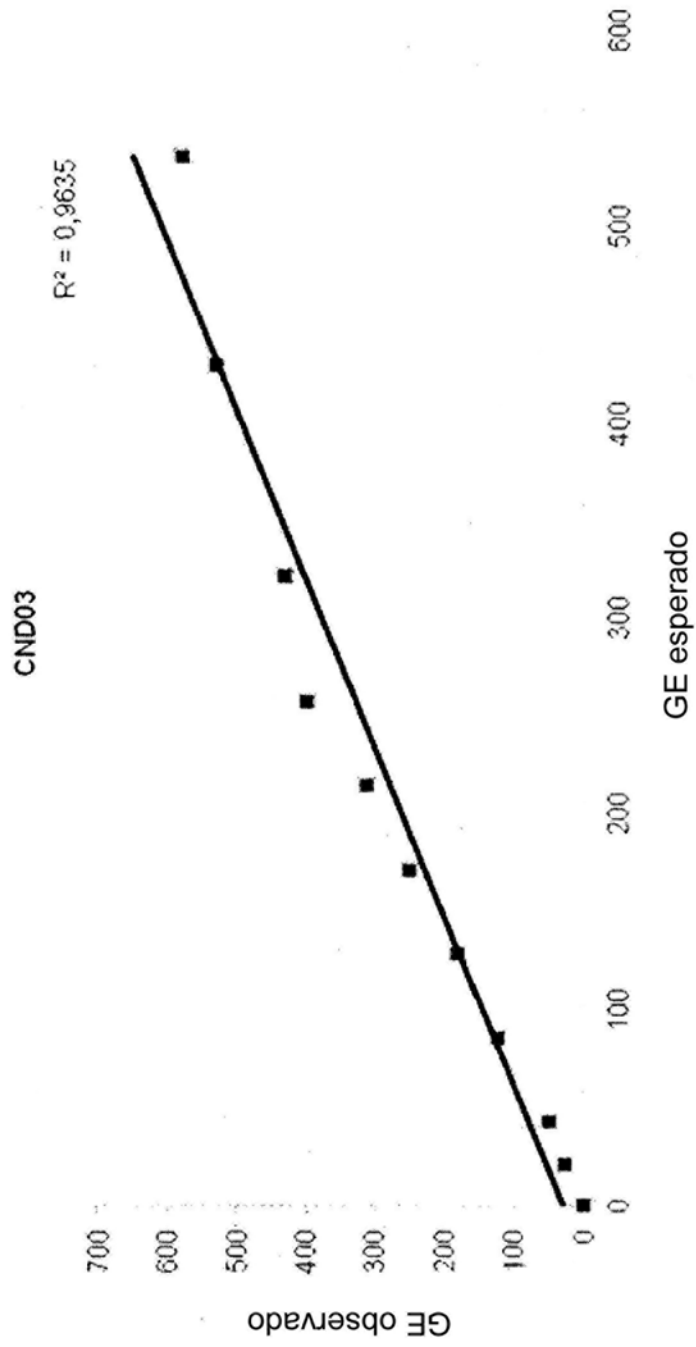


Figura 5c

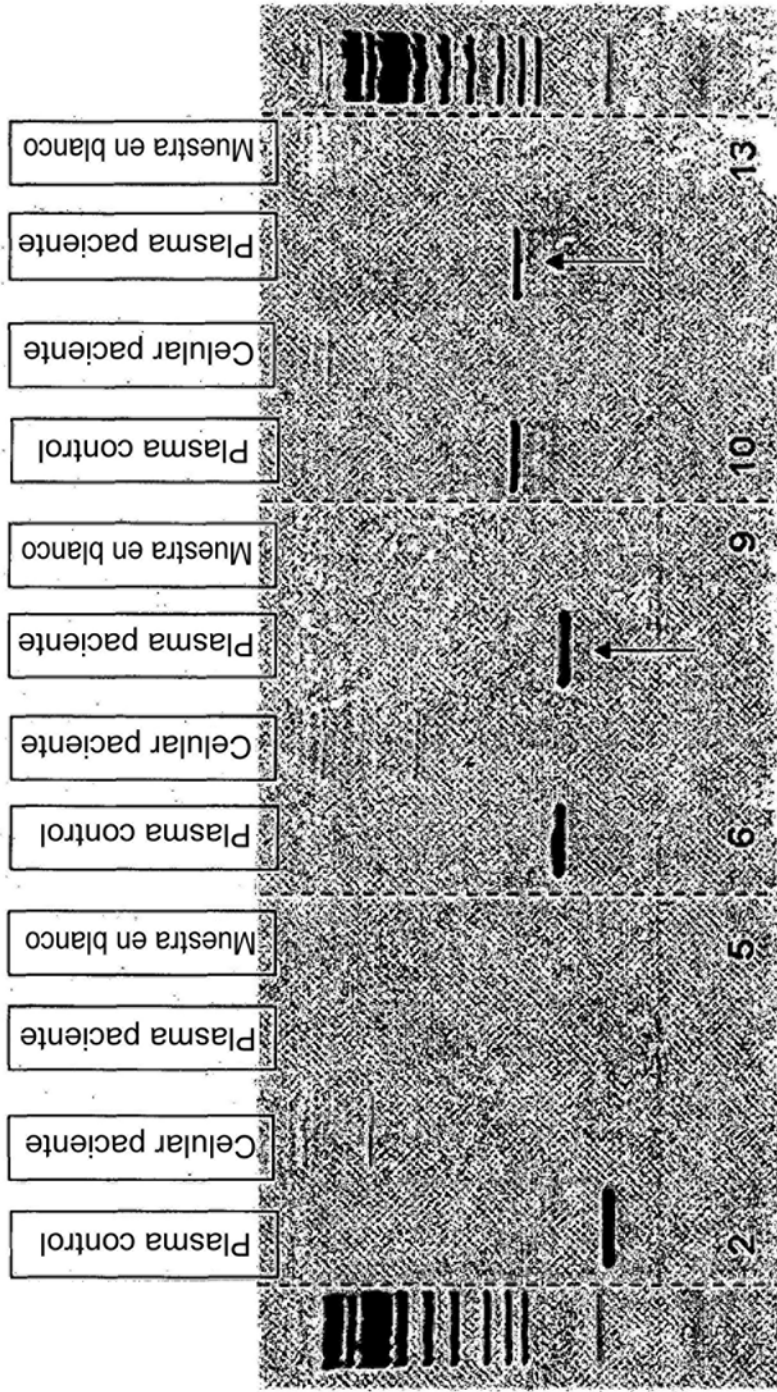


Figura 6

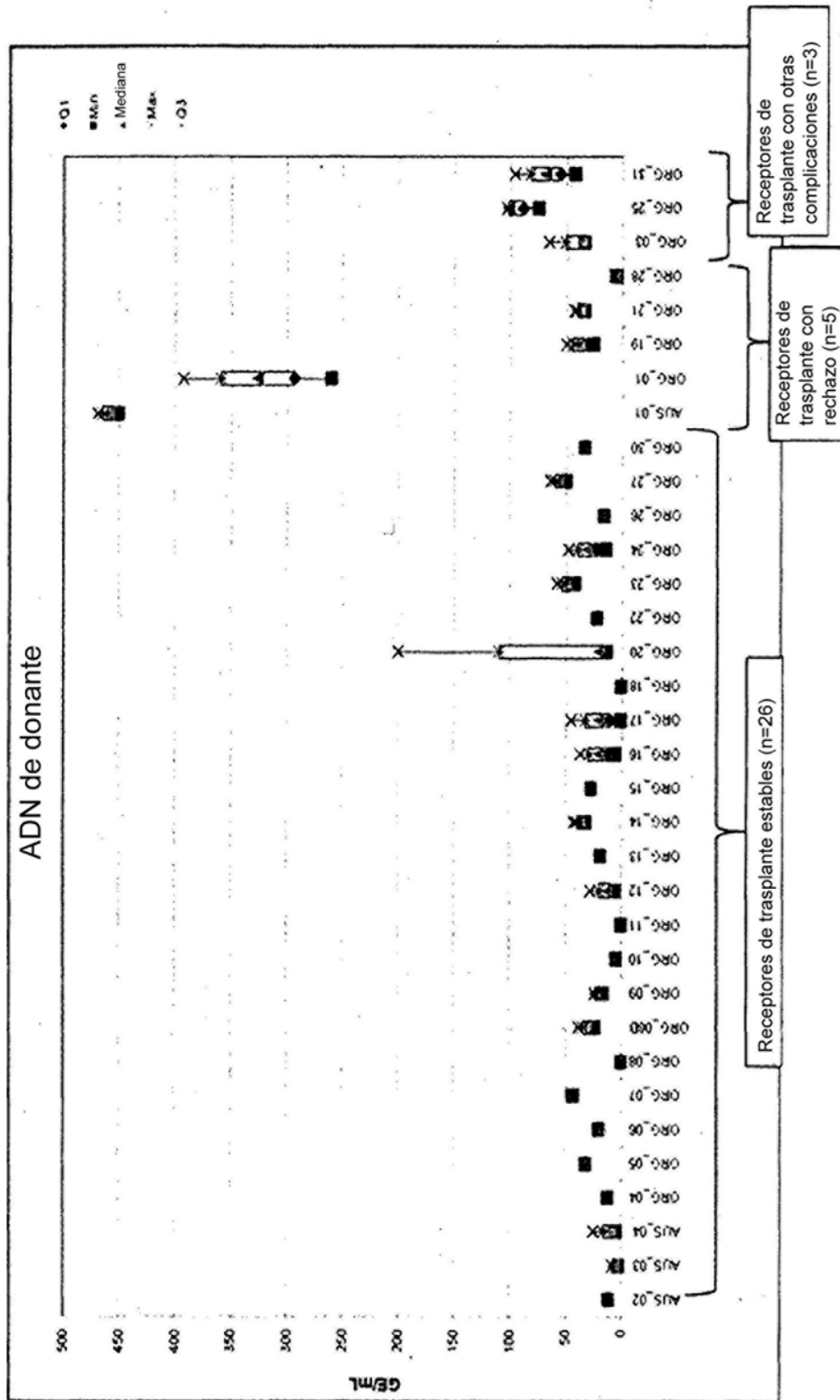


Figura 7a

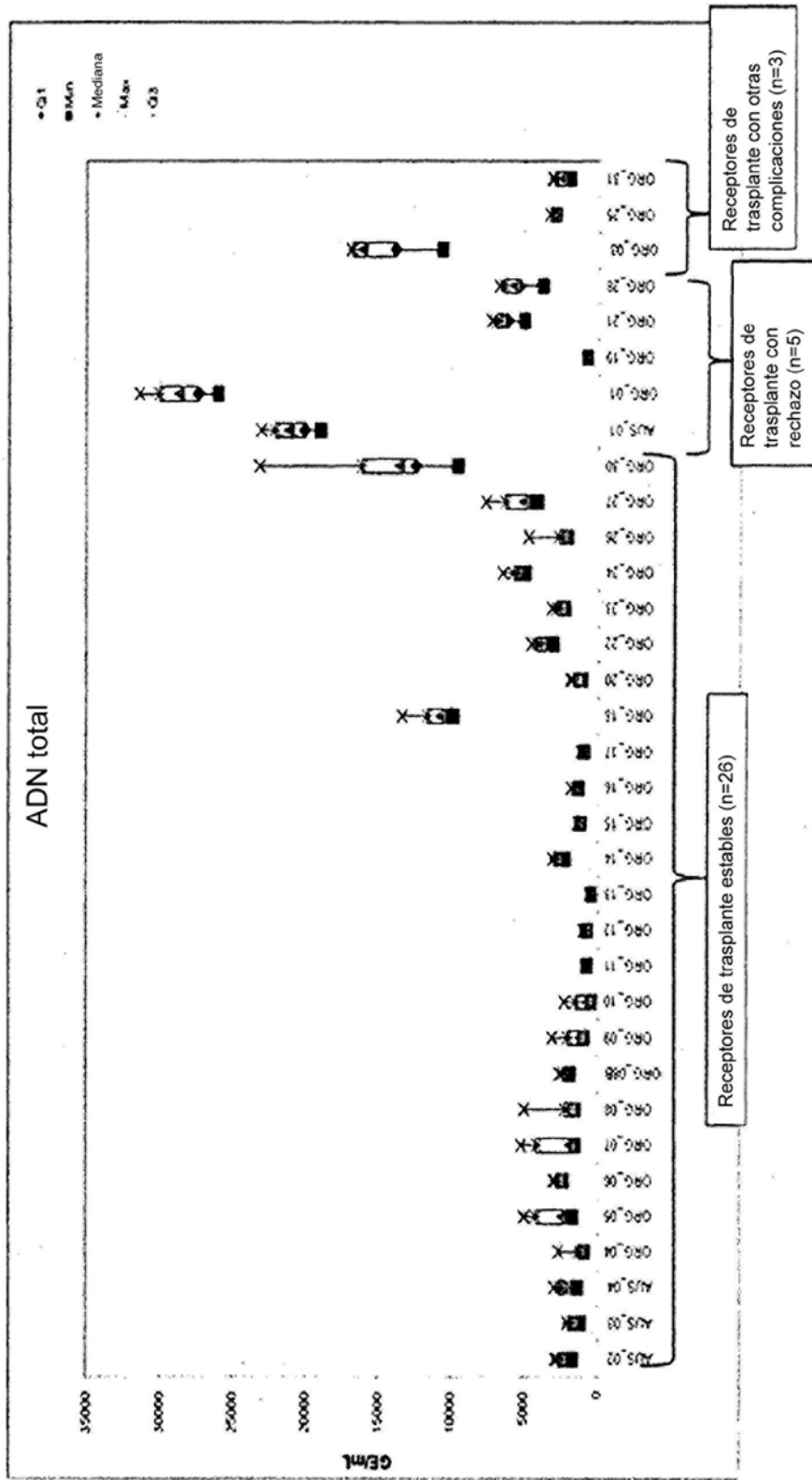
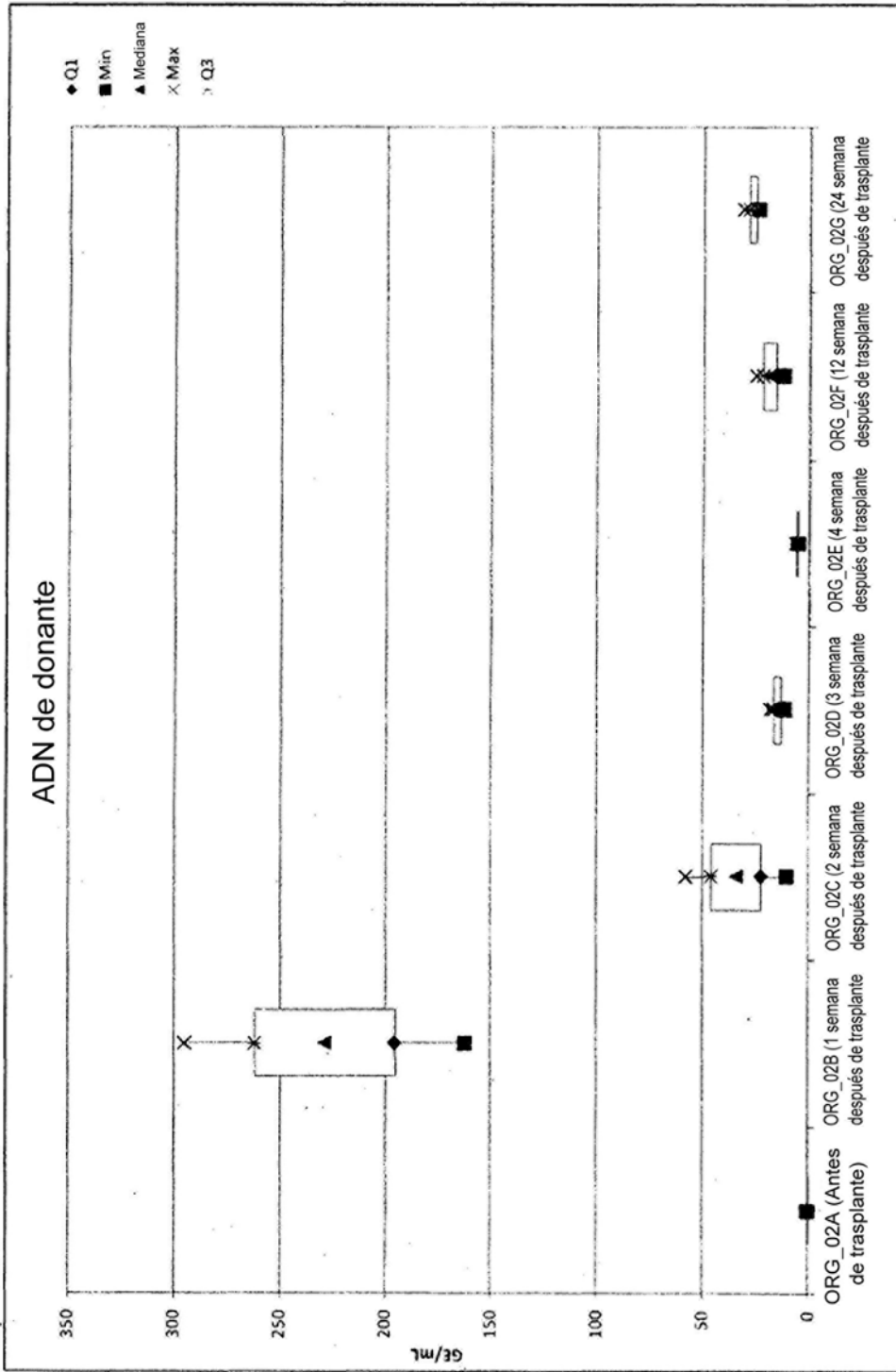


Figura 7b



**Figura 8a**

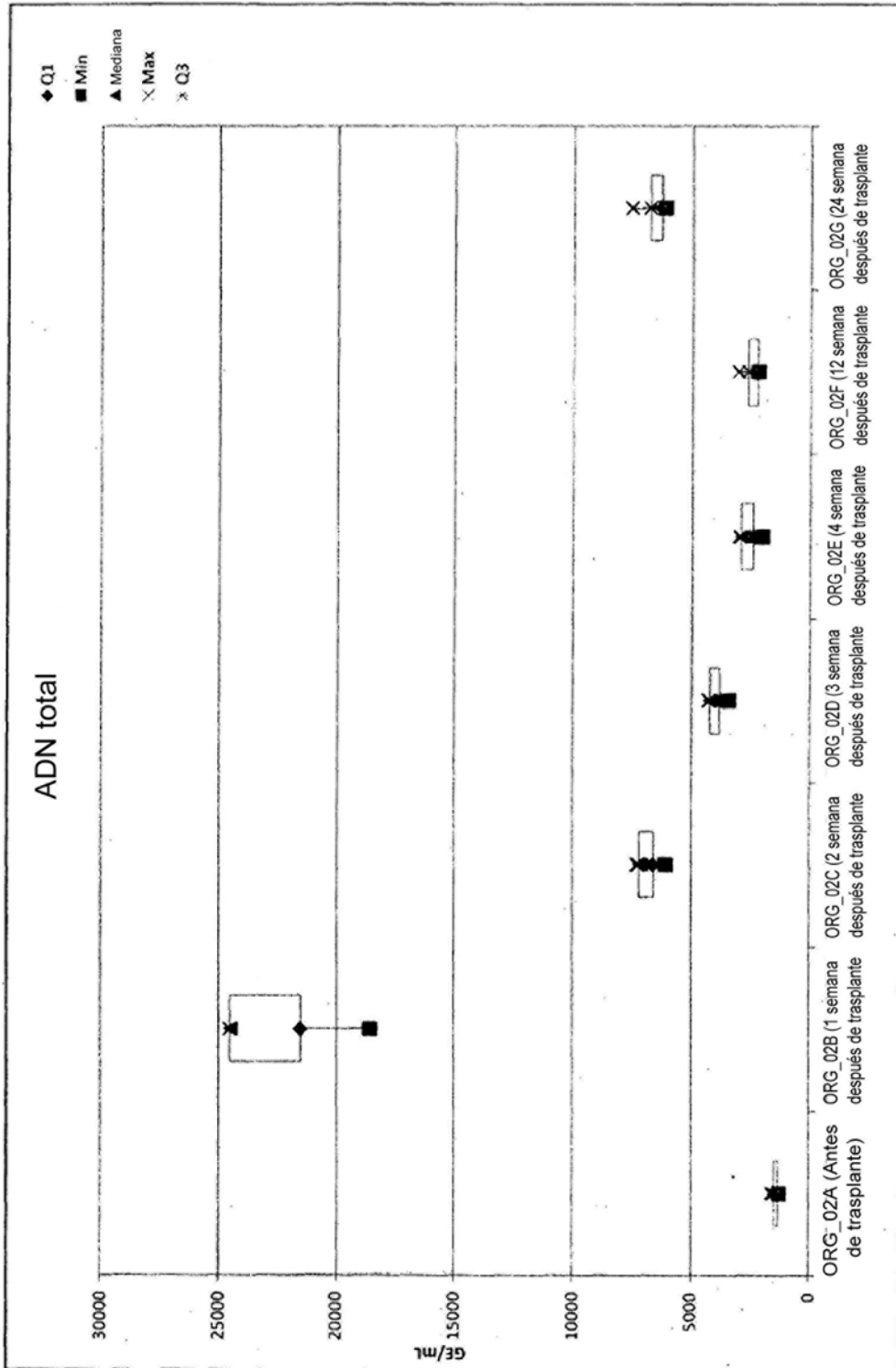


Figura 8b