



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 364**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00979785 .3**

86 Fecha de presentación : **29.11.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1242450**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.09.2002**

54 Título: **Rechazo de trasplante de órganos y a las patologías asociadas.**

30 Prioridad: **29.11.1999 GB 9928136**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2007

73 Titular/es: **Imperial Innovations Limited**
Level 12 Electrical And Electronic Engineering
Building Imperial College
London SW7 2AZ, GB

72 Inventor/es: **Rose, Marlene Lydia;**
Dunn, Michael John y
Linke, Adam

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Rechazo de trasplante de órganos y a las patologías asociadas.

5 Campo de la invención

La presente invención hace referencia al rechazo de trasplante de órganos y a las patologías asociadas y en particular a materiales y procedimientos para el diagnóstico, pronóstico o tratamiento de patologías de rechazo crónicas como la enfermedad de las arterias coronarias asociada al trasplante (TxCAD) o el rechazo crónico después de un trasplante de riñón.

Antecedentes de la invención

Se conocen generalmente tres tipos de rechazo de órganos: hiperagudo, agudo y crónico. El rechazo hiperagudo tiene lugar por lo general a las 24 horas del trasplante y se detecta fácilmente. El rechazo agudo se considera por lo general como un rechazo que tiene lugar durante los seis primeros meses del trasplante. El rechazo agudo puede diagnosticarse de forma relativamente fácil, por ejemplo, en el caso de un trasplante cardíaco por la aparición de ciertos tipos celulares en el infiltrado de células de la biopsia, y en el caso de trasplantes de riñón y de hígado por el cambio en los niveles de ciertas enzimas del suero. Se considera un rechazo crónico aquel que ocurre por lo menos seis meses después del trasplante, es muy difícil de diagnosticar clínicamente y puede que no se manifieste de forma evidente durante algunos años, siendo por lo general el tratamiento insatisfactorio durante dicho tiempo.

En el rechazo crónico existe una vasculopatía típica en el órgano rechazado. La enfermedad de las arterias coronarias asociada (TxCAD), una enfermedad vascular oclusiva de rápido progreso que se desarrolla durante el trasplante de corazón, es la complicación más importante después del primer año del trasplante cardíaco, con una incidencia del 40% a los 5 años post-trasplante. Una vasculopatía similar tiene lugar después del trasplante de riñón si ocurre un rechazo crónico. Las incidencias más elevadas de la enfermedad se reportaron con la utilización de un aparato de ultrasonidos intravasculares. Histológicamente, los vasos injertados se ocluyen con una lesión de la íntima que consiste de células musculares lisas, miofibroblastos y depósito de proteínas de la matriz extracelular.

La etiología de TxCAD permanece mal definida y se han reportado varios factores inmunológicos y no-inmunológicos probablemente asociados con el riesgo de TxCAD. Esta etiología complicada implica que TxCAD sigue siendo de difícil diagnóstico. El corazón desinnervado, por ejemplo, previene los síntomas de angina y la distribución concéntrica de las lesiones pueden oscurecer la evidencia angiográfica de la estenosis. El rechazo crónico de otros órganos también puede ser muy difícil de diagnosticar clínicamente. Por ejemplo, en el caso de trasplantes renales, el rechazo no puede diferenciarse de la nefrotoxicidad de la ciclosporina.

El daño inmunológico de los órganos trasplantados continúa siendo la mayor complicación y causa más importante de morbilidad y mortalidad, especialmente después de un trasplante cardíaco. Se ha descrito la existencia de células T por debajo del endotelio por tinción inmunohistoquímica en las placas ateroscleróticas de pacientes con enfermedad de las arterias coronarias. Sin embargo, estas células T invaden el endotelio en un estadio temprano de la enfermedad mucho antes de que exista una evidencia angiográfica de las anomalías. La integridad del endotelio se considera un factor crucial en el mantenimiento de la función normal de los vasos y la lesión endotelial es seguramente el evento más temprano indicativo de todas las formas de arteriosclerosis. Los anticuerpos anti-endotelio pueden ser altamente destructivos, por ejemplo causar un rechazo rápido de los órganos xerografiados. Aunque existen evidencias de modelos experimentales que apoyan el papel patogénico de los anticuerpos en los rechazos crónicos, la asociación en el hombre sigue estando lejos de ser clara, en particular respecto a la especificidad de los anticuerpos generados después del trasplante y si de hecho dichos anticuerpos pueden lesionar los tejidos injertados.

Hasta la fecha, los autoantígenos endoteliales se han caracterizado mediante transferencia de Western. Los métodos de la transferencia de Western separan los péptidos endoteliales mediante electroforesis en gel unidimensional. Este procedimiento sólo puede expresar un número limitado de antígenos porque muchos péptidos distintos, con el mismo peso molecular pero cargas distintas, aparecerán en la misma banda. Una mejor aproximación es separar los péptidos endoteliales por su carga y peso molecular utilizando una electroforesis de 2D e hibridar a continuación las transferencias con los sueros de los pacientes.

En un principio se han utilizado técnicas para identificar aproximadamente 40 proteínas citosólicas inmunoreactivas de las cuales aproximadamente el 30% pudieron identificarse por secuenciación amino-terminal. El antígeno inmunoreactivo más abundante se identificó como el filamento intermedio de la vimentina, véase la patente americana US 5.716.787 y Wheeler y col., 1995. Según ello, estas referencias describen que la proteína del citoesqueleto vimentina o los anticuerpos anti-vimentina son marcadores que pueden utilizarse en el diagnóstico de TxCAD o el rechazo crónico en el trasplante renal.

Sin embargo, la electroforesis 2-D presenta un problema al carecer de una completa sensibilidad para detectar las proteínas más inmunoreactivas ya que puede que no sean suficientemente abundantes como para permitir su caracterización química. Según ello, sigue siendo un problema en la materia hallar marcadores que puedan proporcionar un diagnóstico exacto y temprano del rechazo crónico.

Resumen de la invención

En términos generales, la presente invención hace referencia a marcadores asociados con el rechazo del trasplante de órganos y patologías asociadas, y en particular proporciona materiales y procedimientos para el diagnóstico, pronóstico o el tratamiento del rechazo crónico, por ejemplo, en patologías como el TxCAD o el rechazo crónico del trasplante de riñón. Este trabajo surge deriva del hecho de que los anticuerpos anti-endoteliales son responsables de la activación y lesión celular, que a su vez conduce al rechazo del trasplante de órganos.

Sin querer definirse por ninguna teoría en concreto, los inventores creen que en la enfermedad coronaria asociada con el trasplante de corazón, la autoinmunidad humoral o la aloinmunidad contra las células endoteliales desempeña un papel importante en la patogenia de la enfermedad. Según ello, el trabajo que conduce a la presente invención se basa en la utilización del clonaje y expresión para identificar las dianas reconocidas por los anticuerpos anti-endoteliales en pacientes con TxCAD. Las muestras de pacientes que contienen anticuerpos se utilizaron para cribar una librería de expresión de cDNAs endoteliales humanos para identificar y aislar los antígenos correspondientes. Estos antígenos se recuperaron a continuación, se subclonaron, secuenciaron y se utilizaron en los ensayos.

Según ello, en un primer aspecto, la presente invención proporciona la utilización de la presencia o la cantidad de proteína ribosomal L-7, β -transducina, 1-TRAF (también conocido como TANK) o lisil-tRNA sintetasa, o anticuerpos contra estos antígenos, como un marcador para el diagnóstico y/o pronóstico del rechazo crónico y patologías asociadas en una muestra de un paciente. En realizaciones preferidas, la presente invención describe nuevos marcadores para la identificación serológica de la enfermedad de las arterias coronarias después de un trasplante cardíaco y el rechazo crónico después de un trasplante de riñón.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de diagnóstico del rechazo crónico o patologías asociadas, por ejemplo la enfermedad de las arterias coronarias (TxCAD) o el rechazo del órgano trasplantado, el procedimiento que comprende la determinación de la presencia o la cantidad de proteína ribosomal L-7, β -transducina, 1-TRAF (también conocido como TANK) o lisil-tRNA sintetasa, o anticuerpos contra estos antígenos, como un marcador para el diagnóstico y/o pronóstico del rechazo crónico y patologías asociadas en una muestra de un paciente.

En una realización preferida, el procedimiento comprende las etapas de:

(a) contactar una muestra de un paciente con un soporte sólido que comprende un agente de unión inmovilizado que contiene sitios de unión capaces de unirse específicamente al antígeno o al anticuerpo en condiciones tales que el anticuerpo o el antígeno se unan al agente de unión; y,

(b) determinar la presencia o la cantidad del anticuerpo o antígeno unidos con el agente de unión.

En una realización, la etapa (b) comprende (i) el contacto del soporte sólido con un agente de revelado que es capaz de unirse a los sitios ocupados, sitios desocupados o al anticuerpo o al antígeno, dicho agente de revelado comprende un marcaje; y (ii) detectar el marcaje para obtener un valor representativo de la presencia o la cantidad de anticuerpo o antígeno en la muestra. Ejemplos de marcajes se describen más adelante. En una realización adecuada, el marcaje es una enzima que produce un resultado detectable al actuar sobre un sustrato, por ejemplo en el ensayo de tipo ELISA. En una realización alternativa, el analito se detecta en la etapa (b) mediante destinación, para permitir su detección cuando se una al agente de unión en el BioChip. Las técnicas de destinación son bien conocidas en la materia.

En algunas realizaciones, el procedimiento utiliza una proteína inmovilizada en un ensayo para anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-endoteliales) en una muestra que es capaz de unirse a la proteína. Alternativamente, la proteína puede ser el analito diana del ensayo, por ejemplo, la unión a anticuerpos inmovilizados en el soporte sólido. Se describen formatos preferidos de ensayos con mayor detalle más adelante.

Con el fin de proporcionar un procedimiento de diagnóstico y/o pronóstico que sea más preciso que la técnica precedente, el procedimiento puede utilizarse opcionalmente para determinar la presencia o la cantidad de una gran diversidad de marcadores proteicos o anticuerpos asociados con el rechazo del trasplante de órganos en una muestra de un paciente. De forma adecuada, los ensayos para los marcadores diferentes pueden llevarse a cabo mediante la utilización de diversos agentes de unión distintos, siendo cada uno específico para un analito distinto en la muestra. Los agentes de unión se inmovilizan en localizaciones predefinidas (es decir, separadas espacialmente) en el soporte sólido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un equipo para la utilización en el diagnóstico o pronóstico del rechazo crónico mediante la determinación de la presencia o la cantidad de un analito seleccionado entre la proteína ribosomal L-7, la β -transducina, 1-TRAF (también conocido como TANK) o la lisil-tRNA sintetasa, o anticuerpos contra estos antígenos en una muestra de un paciente, el equipo comprende:

(a) un soporte sólido que contiene un agente de unión capaz de unirse con el analito inmovilizado;

(b) un agente de revelado que es capaz de unirse en los sitios de unión ocupados, sitios de unión desocupados o con el anticuerpo o el antígeno, dicho agente de revelado comprende un marcaje;

c) uno o más componentes seleccionados entre el grupo compuesto de soluciones de lavado, diluyentes y tampones.

A continuación se describen con mayor detalle las realizaciones de la invención por medio de ejemplos y sin limitar el ámbito de la invención.

5

Descripción detallada

Rechazo del trasplante de órganos

10 La presente invención hace referencia al diagnóstico, pronóstico y tratamiento del rechazo crónico de los órganos trasplantados y patologías asociadas. Tal como se mencionó sobre el rechazo crónico, considerando el rechazo que tiene lugar por lo menos a los seis meses después del trasplante, es muy difícil de diagnosticar clínicamente, y puede que no se manifieste claramente durante varios años, tiempo durante el cual el tratamiento es generalmente insatisfactorio.

15 Los marcadores proteicos y anticuerpos descritos aquí pueden utilizarse en el diagnóstico, pronóstico o tratamiento del rechazo del trasplante de órganos, incluyendo el corazón, el riñón, el hígado, el pulmón, otros órganos sólidos, tejidos trasplantados que comprenden células endoteliales como las válvulas del corazón y patologías asociadas con el rechazo de órganos o tejidos. En particular, la presente invención hace referencia al trasplante asociado con la enfermedad de las arterias coronarias (TxCAD) y el rechazo de hígado crónico.

20

En el rechazo crónico se presenta de forma característica una vasculopatía en el órgano rechazado. La enfermedad de las arterias coronarias conocida como enfermedad de la arteria coronaria “acelerada” o “asociada con el trasplante” es la complicación crónica más grave después de un trasplante cardíaco. La abreviatura “CAD” se utiliza aquí para definir la enfermedad de las arterias coronarias acelerada o asociada con el trasplante, excluyendo la enfermedad de 25 las arterias coronarias de cualquier otra etiología. CAD y la vasculopatía correspondiente en otros órganos rechazados puede considerarse como una manifestación del rechazo de un órgano trasplantado o como una patología asociada con el rechazo. En la presente especificación CAD y la vasculopatía en otros órganos se trata como una patología asociada con el rechazo pero debe entenderse que la descripción de la patología asociada en dichos términos no es limitante.

30 *Ensayos*

Los procedimientos para determinar la concentración de los analitos en las muestras de individuos son bien conocidos en la materia y fácilmente adaptables por el experto en la materia en el contexto de la presente invención para determinar la presencia o la cantidad de marcadores proteicos o fragmentos de lo mismo, o de anticuerpos contra los 35 marcadores en una muestra de un paciente. Los resultados de dichos ensayos pueden a su vez permitir a un clínico determinar si un paciente sufre de una patología asociada o presenta un riesgo de desarrollar un rechazo crónico o una patología asociada. También puede facilitarse al clínico el optimizar el tratamiento de las patologías asociadas. De este modo, se permite la planificación de un tratamiento terapéutico y/o profiláctico, lo que permite continuar en la línea del tratamiento dirigiéndose a los probablemente más beneficiosos.

40

Los procedimientos se dirigen al diagnóstico y/o pronóstico del rechazo del trasplante de órganos, en particular la enfermedad de las arterias coronarias asociada con el trasplante (TxCAD) y el rechazo crónico del trasplante de hígado.

45 Los procedimientos utilizan de forma típica una muestra biológica del paciente como sangre, suero, tejidos, orina u otro fluido corporal adecuado. Una muestra preferida del paciente es un tejido de células endoteliales obtenidas de un vaso importante o de monocitos.

Los procedimientos del ensayo para la determinación de la concentración de los marcadores proteicos o de anticuerpos utiliza típicamente agentes de unión con sitios de unión capaces de unirse específicamente a los marcadores proteicos, o a los fragmentos de lo mismo, o los anticuerpos de preferencia a otras moléculas. Ejemplos de agentes de unión incluyen los anticuerpos, los receptores y otras moléculas capaces de unirse específicamente al analito de interés. De forma adecuada, los agentes de unión se inmovilizan sobre un soporte sólido, por ejemplo en localizaciones 50 definidas y separadas espacialmente, para facilitar su manipulación durante el ensayo.

55

La muestra se contacta por lo general con el(los) agente(s) de unión en las condiciones adecuadas que permiten la unión del analito en la muestra con el(los) agente(s) de unión. El porcentaje de ocupación de los sitios de unión del (los) agente(s) de unión puede determinarse bien por marcaje directo o indirecto del analito o mediante un agente revelador que permite obtener una indicación de la presencia o de la cantidad del analito en la muestra. Típicamente, el agente revelador se marca directa o indirectamente (por ejemplo, con marcajes radioactivos, fluorescentes o enzimáticos, como la peroxidasa de rábano) de modo que pueda detectarse mediante la utilización de técnicas bien conocidas en la materia. Los agentes de revelado marcados de forma directa tienen un marcaje asociado con o acoplado al agente. Los agentes de revelado marcados indirectamente pueden ser capaces de unirse a una especie marcada (por ejemplo un anticuerpo marcado capaz de unirse al agente de revelado) o pueden actuar sobre otra especie para producir 65 un resultado detectable. En consecuencia, los marcajes radioactivos pueden detectarse mediante la utilización de un contador de centelleo u otro dispositivo de conteo de radiación, marcajes fluorescentes con la utilización de un láser y microscopía confocal, y marcajes enzimáticos por la acción de un marcaje enzimático sobre un sustrato, típicamente para producir un cambio de color. En otras realizaciones, el agente de revelado o el analito se marca para permitir

su detección, por ejemplo, se une a una secuencia nucleotídica que puede amplificarse en una reacción de PCR para detectar el analito. Otros marcajes conocidos por los expertos en la materia se discuten más adelante. El(los) agente(s) de revelado pueden utilizarse en un procedimiento competitivo en el que el agente de revelado compite con el analito por los sitios de unión ocupados del agente de unión, o el procedimiento no competitivo, en el que el agente de revelado marcado se une al analito unido por el agente de unión o a los sitios de unión ocupados. Ambos procedimientos proporcionan una indicación del número de sitios de unión ocupados por el analito y por tanto de la concentración del analito en la muestra, por ejemplo, mediante comparación con los estándares obtenidos utilizando muestras que contienen concentraciones conocidas del analito.

En realizaciones alternativas, el analito puede marcarse antes de aplicarse al soporte que comprende el agente de unión.

En un formato preferido, la presencia o la cantidad de proteína ribosomal L7, la β -transducina, 1-TRAF (también conocido como TANK), la lisil-tRNA sintetasa, o los anticuerpos contra estos antígenos se determina en un ensayo ELISA.

Existe también una tendencia al aumento en el campo diagnóstico hacia la miniaturización de estos ensayos, por ejemplo, utilizando agentes de unión (como los anticuerpos o secuencias de ácido nucleico) inmovilizados en localizaciones pequeñas, discretas (micromanchas) y/o chips en soportes sólidos o chips de diagnóstico. Estas aproximaciones pueden ser de particular interés ya que pueden proporcionar una gran sensibilidad (en particular a través de la utilización de reactivos de marcaje fluorescente), que requieren únicamente muy pequeñas cantidades de la muestra biológica de individuos a analizar y permiten una diversidad de ensayos separados que pueden llevarse a cabo simultáneamente. Esta última ventaja puede ser útil ya que proporciona un ensayo que analiza diversos analitos en una sola muestra. Ejemplos de técnicas que permiten esta tecnología miniaturizada se proporcionan en las patentes internacionales WO84/01031, WO88/1058, WO89/01157, WO93/8472, WO95/18376, WO95/18377, WO95/24643 y en la patente europea EP 0373 203 A. Por ello, en otro aspecto, la presente invención proporciona un equipo que comprende un soporte o chip de diagnóstico que tiene inmovilizados una diversidad de agentes de unión capaces de unirse específicamente a marcadores proteicos distintos o anticuerpos, y opcionalmente en combinación con otros reactivos (como los reactivos de revelado marcados) necesarios para llevar a cabo un ensayo. En esta línea, el soporte puede incluir agentes de unión específicos del analito como la vimentina, por ejemplo, como el descrito en la patente americana US 5.716.787.

Expresión de proteínas

Después de la identificación de los marcadores proteicos asociados con el rechazo del trasplante de órganos, es posible producir grandes cantidades de proteína mediante la utilización de técnicas de expresión bien conocidas en la materia. La producción de proteína de este modo puede utilizarse como un agente de unión, inmovilizándolo en un soporte sólido en un ensayo para anticuerpos en una muestra de un paciente, o como un inmunógeno para producir anticuerpos. Alternativamente, la proteína, o fragmentos de lo mismo, pueden utilizarse en el tratamiento terapéutico del rechazo del trasplante de órganos, es decir, para mejorar los efectos nocivos de los anticuerpos.

Son bien conocidos los sistemas de clonaje y expresión de un polipéptido en diversas células huésped distintas. Las células huésped adecuadas incluyen las bacterias, las células eucariotas como las de mamífero y de levadura y los sistemas de baculovirus. Las líneas de células de mamífero disponibles en la materia para la expresión de un polipéptido heterólogo incluye las células de ovario de hámster chino, las células HeLa, las células de riñón de cría de hámster, las células COS y muchas otras. Una bacteria huésped comúnmente preferida es *E. coli*.

Los vectores adecuados pueden elegirse o construirse con secuencias reguladoras adecuadas, incluyendo secuencias promotoras, fragmentos de finalización, secuencias de poliadenilación, secuencias intensificadoras, genes marcadores y otras secuencias adecuadas. Los vectores pueden ser plásmidos, virus, por ejemplo fagos, o fagémidos. Para más detalles, véase por ejemplo Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook y col., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas de las técnicas y protocolos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción del DNA en las células y expresión génica y análisis de proteínas se describen en detalle en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel y col., eds., John Wiley & Sons, 1992.

Después de la transformación de las células huésped con el ácido nucleico que codifica las proteínas, es posible generarlas al permitir su expresión a partir del ácido nucleico, por ejemplo mediante el cultivo de células huésped (que pueden incluir células transformadas, aunque muy probablemente las células serán descendientes de estas células transformadas) en condiciones para la expresión del gen, de modo que se produzca el polipéptido codificado. Si el polipéptido se expresa acoplado a un péptido líder adecuado, puede secretarse a partir de la célula en el medio de cultivo. Después de la producción por la expresión, es posible aislar un polipéptido y/o purificarlo a partir de la célula huésped y/o medio de cultivo, como puede ser el caso, y a continuación utilizarse según se desee, por ejemplo, en la formulación de una composición que puede incluir uno o más componentes, como una composición farmacéutica que incluye uno o más excipientes, vehículos o transportadores farmacéuticamente aceptables.

Anticuerpos

En realizaciones alternativas de la invención, pueden ser necesarios anticuerpos capaces de unirse a la proteína asociada con el rechazo del trasplante de órganos, por ejemplo para su utilización en ensayos de determinación de la presencia o de la cantidad de una proteína determinada en una muestra, o para fines terapéuticos en la reducción de los efectos adversos de una proteína *in vivo*. Por tanto, la presente invención también proporciona la producción de anticuerpos que tienen la propiedad de unirse específicamente a las proteínas marcadoras identificadas aquí, o los fragmentos de porciones activas de lo mismo.

La producción de anticuerpos monoclonales está bien establecida en la materia. Los anticuerpos monoclonales pueden someterse a las técnicas del DNA recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que retengan la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden implicar la introducción del DNA que codifica la región variable de la inmunoglobulina, o las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), de un anticuerpo con las regiones constantes, o las regiones constantes más las regiones de entramado, de una inmunoglobulina distinta. Véase, por ejemplo, las patentes EP 0 184 187 A, GB 2 188 638 o EP 0 239 400. Un hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal puede someterse a una mutación genética u otros cambios, que pueden o no alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

Estos anticuerpos pueden ser específicos en el sentido de ser capaces de diferenciar entre el polipéptido capaz de unirse y otros polipéptidos por los que no tiene afinidad de unión (por ejemplo, una afinidad superior a aproximadamente 10^3 , preferentemente 10^4 y más preferentemente 10^5 veces superior a las moléculas no relacionadas). Los anticuerpos específicos se unen a un epítopo en la molécula que no está presente o no es accesible en otras moléculas. Los anticuerpos también son de utilidad en la purificación del polipéptido o polipéptidos a los cuales se une, por ejemplo, después de la producción por expresión recombinante del ácido nucleico codificante.

Los anticuerpos preferidos de acuerdo con la invención se aíslan, es decir se liberan de los contaminantes para que los anticuerpos sean capaces de unirse a otros polipéptidos y/o liberados de los compuestos del suero. Los anticuerpos monoclonales son los preferidos para algunos propósitos, aunque los anticuerpos policlonales se hallan dentro de la presente invención.

Los anticuerpos pueden obtenerse mediante la utilización de técnicas que son estándares en la materia. Los procedimientos de producción de anticuerpos incluyen la inmunización de un mamífero (por ejemplo, el ratón, la rata, el conejo, el caballo, la cabra, la oveja o el mono) con la proteína o un fragmento de lo mismo. Los anticuerpos pueden obtenerse a partir de animales inmunizados utilizando una diversidad de técnicas conocidas en la materia, y cribarse utilizando de preferencia la unión del anticuerpo al antígeno de interés. Por ejemplo, las técnicas de transferencia de Western o de inmunoprecipitación pueden utilizarse (Armitage y col., Nature, 357:80-82, 1992). El aislamiento de los anticuerpos y/o las células productoras del anticuerpo de un animal puede acompañarse de una etapa de estabilización del animal.

Como una alternativa o complemento a la inmunización de un animal con un péptido, un anticuerpo específico para una proteína puede obtenerse de una librería producida de forma recombinante de los dominios variables de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante la utilización del bacteriófago lambda o del bacteriófago filamentosos que expresa los dominios de unión de inmunoglobulina funcional en sus superficies; por ejemplo véase la patente internacional WO92/01047. La librería puede ser *naïve* es decir que está construida de secuencias obtenidas de un organismo que no ha sido inmunizado con ninguna de las proteína (o fragmentos), o puede construirse con secuencias obtenidas de un organismo que se ha expuesto al antígeno de interés.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden modificarse de diversas formas. Incluso el término "anticuerpo" debería considerarse como aquél que abarca cualquier sustancia de unión que tenga un dominio de unión con la especificidad requerida. Por tanto, la invención abarca fragmentos de anticuerpo, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo moléculas sintéticas y moléculas cuya forma mimetiza la de un anticuerpo capaz de unirse a un antígeno o epítopo.

Los hibridomas capaces de producir anticuerpos con las características de unión deseadas se hallan dentro del ámbito de la presente invención, como lo son las células huésped, eucariotas o procariotas, que contienen el ácido nucleico que codifica los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) y son capaces de su expresión. La invención también proporciona los procedimientos de producción de los anticuerpos que incluyen el crecimiento de una célula capaz de producir el anticuerpo en condiciones tales en las que se produce y secreta el anticuerpo.

Los anticuerpos para la utilización en ensayos descritos aquí como los agentes de unión o revelado pueden ser marcados. El marcaje con moléculas reporteras individuales es una posibilidad. Las moléculas reporteras pueden generar señales directa o indirectamente detectables y preferentemente cuantificables. La unión de las moléculas reporteras puede ser directa o indirectamente covalente, por ejemplo mediante un enlace peptídico, o no covalente. La unión mediante un enlace peptídico puede ser el resultado de la expresión recombinante de una fusión génica que codifica el anticuerpo o la molécula reportera. Un modo preferido es mediante la unión covalente de cada anticuerpo con un fluorocromo individual, fósforo o colorante láser con una absorción espectral o características de emisión aisladas. Los fluorocromos adecuados incluyen la fluoresceína, la rodamina, la ficoeritrina y el Texas Red. Colorantes cromogénicos adecuados incluyen la diaminobencidina. Otros reporteros incluyen partículas coloidales macromoleculares o

material particulado como las perlas de látex que son coloreadas, magnéticas o paramagnéticas, y los agentes activos biológica o químicamente que pueden producir señales detectables de forma directa o indirecta para ser visualizados directamente o con ayuda del microscopio, u otra forma. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalizan las reacciones que desarrollan o cambian los colores o provocan cambios en las propiedades, por ejemplo, eléctricas. Pueden excitarse molecularmente, de modo que las transiciones electrónicas entre los estados energéticos den como resultado absorciones o emisiones espectrales características. Estas pueden incluir entidades químicas utilizadas junto con biosensores. Pueden utilizarse los sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina. Otras técnicas que pueden utilizarse para marcar anticuerpos incluyen la destinación, por ejemplo con una secuencia nucleotídica que puede amplificarse por PCR.

El modo de determinar la unión no es una característica de la presente invención y los expertos en la materia son capaces de elegir un modo adecuado de acuerdo con sus preferencias y conocimientos generales.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse para determinar la presencia de un polipéptido, por ejemplo en una muestra a analizar que contenga células o en el lisado celular tal como se discutió anteriormente, y puede utilizarse en la purificación y/o aislamiento de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo después de la producción del polipéptido mediante expresión del ácido nucleico codificante. Los anticuerpos pueden modular la actividad del polipéptido al que se unen y de este modo, si el mencionado polipéptido tiene un efecto nocivo en un individuo, puede ser de utilidad en un contexto terapéutico (pudiendo incluirse la profilaxis).

En un equipo puede proporcionarse un anticuerpo, dicho equipo incluirá las instrucciones para la utilización del anticuerpo, por ejemplo en la determinación de la presencia de una sustancia determinada en una muestra a analizar. También se pueden incluir uno o más reactivos, como moléculas de marcaje, soluciones tampón, eluyentes y otros. Los reactivos pueden hallarse en recipientes que los protejan del entorno exterior, como por ejemplo un vial sellado.

Materiales y métodos

Muestras de pacientes

Se cribaron previamente 70 pacientes (trasplantados entre 1988-1996) que habían desarrollado TxCAD para los anticuerpos anti-endoteliales (AECA) mediante la utilización de la transferencia de Western y el ELISA anti-vimentina. Para este grupo, estuvieron disponibles sueros secuenciales para cada año después del trasplante. En estos estudios, se utilizó suero de pacientes de uno a 8 años después del trasplante; en dicho momento los pacientes presentaban AECA aunque los anticuerpos anti-HLA (que podían haber estado presentes poco después del trasplante) no fueron detectables. Se seleccionaron 10 sueros según su reactividad amplia en las transferencias de Western (utilizando tanto preparaciones de HUVEC como de membranas de HUVEC), lo que aseguró que las muestras tuvieran un elevado título de IgM AECA según el ELISA cuantitativo que hemos desarrollado (Jurcevic y col., 1998). Los estudios previos han mostrado que la subclase AECA generada en los pacientes TxCAD es IgM. Como controles negativos, se utilizó el suero de 10 voluntarios sanos.

Librería de cDNA endotelial

Los sueros de pacientes positivos identificados en el ELISA de vimentina y en la transferencia de Western se cribaron inmunológicamente sobre la librería de expresión de cDNA endotelial, utilizando una librería de cDNA endotelial en lambda ZAP disponible comercialmente (extensión 5' endotelial humana, Stratagene, Cambridge, UK) que puede ser cribada serológicamente. La fuente de mRNA de la librería de cDNA es un agrupado de células endoteliales del primer pasaje homogéneo de 5 individuos de HUVEC. Las colonias clonadas se crecieron en condiciones adecuadas (medios selectivos que contenían ampicilina para las librerías construidas en fagémidos pBluescript) con la adición de IPTG.

Sistema de detección de la unión al anticuerpo

Encima de las placas de bacterias de 150 mm de diámetro (que contenían aproximadamente 10^4 calvas) se colocaron filtros de nitrocelulosa impregnados de IPTG durante 3,5 horas a 37°C. A continuación se utilizó un lisado de bacterias y fagos para absorber los anticuerpos anti-*E. coli* con el fin de evitar que se contaminara el anticuerpo primario. La unión del anticuerpo del paciente con las proteínas endoteliales expresadas sobre los filtros de nitrocelulosa, después del bloqueo, se identificó con un anticuerpo secundario anti-Ig humana conjugado con fosfatasa alcalina. Las calvas positivas se recortaron y los fagos eluidos se utilizaron para reinfectar bacterias huésped. Se realizaron tres tandas de cribado inmunológico hasta purificar a homogeneidad los clones positivos. El vector Uni-ZAP XR se utilizó para liberar *in vivo* el fagémido, permitiendo caracterizar el inserto en un sistema de plásmidos. Los clones positivos se secuenciaron a continuación y se determinó la complementariedad de la secuencia de DNA para los clones positivos mediante el paquete GCG de la Universidad de Wisconsin.

Preparación de proteínas recombinantes de antígenos candidatos para utilizar como estándares

Las proteínas etiquetadas con His de los antígenos candidatos se prepararon mediante clonaje en un vector adecuado de expresión, típicamente el sistema de expresión de T7 (pET) que proporciona muy altos niveles de producción

proteica utilizando estos plásmidos. Para este trabajo se prefiere la utilización del derivado pET15 ya que añade una etiqueta de afinidad corta en el extremo N-terminal de 6 histidinas a las proteínas clonadas. Estas son capaces de unirse a níquel inmovilizado, lo que permite una purificación por afinidad en esencialmente una sola etapa. Dado que la interacción entre el ión metálico y la cola de polihistidinas tiene lugar no sólo en soluciones nativas sino también en las desnaturalizantes (por ejemplo, urea y guanidina), las proteínas recombinantes que forman los cuerpos de inclusión pueden purificarse fácilmente. Los rendimientos típicos de las proteínas de mamífero expresadas de los plásmidos de pET se hallan en el intervalo de 25-200 mg/l de cultivo. Después de las pérdidas en la purificación, se produjeron rendimientos de unos pocos miligramos a partir de cultivos pequeños de bacterias (50-100 ml), una cantidad suficiente para establecer y realizar múltiples inmunoensayos. Para recortar los cDNAs clonados para su inserción en pET15, se utilizó la PCT. El cebador para el extremo 3' de la secuencia se derivó del DNA flanqueante en el vector pBluescript ya que los clones aislados contenían un codón de parada que codificaba el extremo C-terminal. Se generó un cebador por el propio usuario cuya secuencia se dictó por las secuencias de los marcadores proteicos hallados para recortar el extremo 5' de cada uno de los clones. Este cebador contenía una diana de restricción en fase (NdeI, XhoI o BamHI) para permitir la unión en la misma fase de lectura del vector del cDNA. Todos los clones se analizaron por secuenciación del DNA.

Optimización del inmunoensayo

Los antisueros policlonales contra antígenos candidatos se utilizaron como controles positivos buenos para los inmunoensayos, con el fin de proporcionar una prueba del principio, se utilizó el ensayo de anti-vimentina descrito en Jurcevic y col., (1992), con sueros de pacientes como controles positivos. Sin embargo, los anticuerpos policlonales podrían ser útiles para el desarrollo del ensayo y junto con los anticuerpos monoclonales podrían también utilizarse para investigar la distribución de antígenos en tejidos humanos. Los anticuerpos policlonales y monoclonales pueden realizarse tal como se describió anteriormente.

Los ensayos ELISA pueden optimizarse utilizando concentraciones de recubrimiento distintas de las proteínas recombinantes sobre distintos tipos de plástico, y distintas condiciones de recubrimiento, tiempo y temperatura. Dicha optimización determina si los efectos como el pH, fuerza iónica como la carga y la hidrofobicidad desempeñan funciones importantes en los mecanismos por los cuales las proteínas se enganchan al plástico. También pueden probarse diferentes agentes bloqueantes para bloquear los sitios de unión de proteínas vacíos sobre el plástico, así como distintos tiempos de incubación para los anticuerpos primarios y secundarios. Las concentraciones de anticuerpo 3 SD respecto a la media normal de concentración del anticuerpo se consideraron significativamente elevadas. Los coeficientes intra e inter de variación pueden calcularse para valorar la reproducibilidad de los inmunoensayos.

Estimación de la prevalencia y de la cantidad de autoanticuerpos y su asociación con la enfermedad

Después de realizar los inmunoensayos con sueros policlonales, se realizó un estudio retrospectivo de los sueros de pacientes. En Harefield tenemos sueros secuenciales de 70 pacientes con TxCAD (de 1-8 años después del trasplante, 5-8 muestras por paciente) congelados. El anticuerpo secundario (revelador) utilizado fue antisuero anti-IgM humana de cabra conjugado con fosfatasa alcalina. Salvo que se hallaran estándares positivos humanos, se realizaron curvas de titulación por dilución de ambos sueros, paciente y normal, por triplicado. El suero de conejo inmunizado analizado se utilizó como control positivo hasta hallar un control humano positivo adecuado que contenía anti-autoantígeno IgM. Se analizarán todos los sueros TxCAD y sueros controles normales. El análisis estadístico se realizará para valorar la significación de los niveles de anticuerpo comparados con los controles. La información de estos estudios se examinó en relación con la actividad de la enfermedad mediante angiografía anual (realizada en todos los pacientes) y ultrasonidos ultravasculares (realizada en el 20% de nuestros pacientes) por nuestros colegas clínicos en el Hospital Harefield.

Expresión de los marcadores proteicos

La expresión de los marcadores proteicos descritos aquí se examinó mediante inmunocitoquímica en células endoteliales microvasculares y en células endoteliales de arteria coronaria. Además, se examinó si los anticuerpos contra dichos autoantígenos alteraban la función celular endotelial. Se investigó la transducción de señal en células endoteliales mediante unión por anticuerpos. El mapeo de epitopos y el desarrollo del ELISA de péptidos se llevó a cabo para ajustar y mejorar los inmunoensayos.

Resultados

Ejemplo 1

Identificación de los marcadores proteicos

En un experimento preliminar, se utilizaron sueros de pacientes TxCAD para cribar 40.000 genes de la librería de expresión de cDNAs endoteliales y se identificaron un total de 8 clones, que representaban los autoantígenos candidatos reconocidos por los anticuerpos anti-endoteliales. La secuenciación mostró que los antígenos eran proteínas conocidas, disponibles en las bases de datos del GenBank o SwissProt con los códigos de acceso:

Proteína ribosomal humana L7: L16558, X52967, X57959 y X57958;

Véase también Hemmerich y col., (1993), y Seshadri y col., (1993).

B-transducina: M24194;

Véase también Guillemot y col., P.N.A.S. USA (1989).

1-TRAF, también conocida como TANK: U59863 y U63830;

Véase también Kaye y col., 1996.

Lisil-tRNA sintetasa: D32053.

Los resultados de este experimento establecieron el grupo de autoantígenos de células endoteliales en TxCAD y pueden proporcionar nuevos marcadores de diagnóstico para el rechazo del trasplante de órganos para el diagnóstico o pronóstico de patologías como TxCAD o el rechazo renal crónico.

Ejemplo 2

Desarrollo de los ensayos

La proteína ribosomal L7 se identificó en el cribado descrito anteriormente mediante inmunoreactividad para los sueros de pacientes trasplantados en el momento del diagnóstico de CAD. Las proteínas recombinantes etiquetadas con His muestran inmunoreactividad en la transferencia de Western.

Estos resultados se analizaron utilizando un cribado de ELISA de 9 pacientes con TxCAD en los 3 primeros años del trasplante. Esto mostró una prevalencia de 5/9=55,6% comparada con los sueros de controles normales (nivel de corte positivo a una media $\pm 2SD$ del intervalo normal). Estos se comparó con 1/10 =10% de prevalencia en pacientes con trasplante no-CAD.

Los análisis estadísticos utilizaron el test exacto de Fisher.

Tabla de contingencia:

	CAD	no CAD
RPL7-ve	4	9
RPL7+ve	5	1

Asociación significativa a $p < 0,05$

Por tanto, estos resultados demuestran que las proteínas aquí descritas como la proteína ribosomal L7 son buenos antígenos candidatos o autoantígenos para el diagnóstico del rechazo del trasplante en patologías como TxCAD.

Referencias

Patente americana US 5.716.787 (Duna y col.).

Wheeler y col., *J. Herat Lung Transplant*, 14:5188-97, 1995.

Jurcevic y col., *Transplantation*, 65:1197-1202, 1998.

Hemmerlick y col., *Nucleic Acids Res.*, 21:223-231, 1993.

Seshadri y col., *J. Biol. Chem.*, 268:1874-19480, 1993.

Kaye y col., *P.N.A.S.* 93:11085-11090, 1996.

Guillemot y col., *P.N.A.S. USA*, 86(2):4594-4598, 1989.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de la presencia o la cantidad de una proteína la cual es la proteína ribosomal L7, la β -transducina, 1-TRAF o la lisil-tRNA sintetasa, o un anticuerpo capaz de unirse específicamente a una de las proteínas, como un marcador para el diagnóstico y/o pronóstico del rechazo crónico y patologías asociadas en una muestra de un paciente.
2. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el rechazo crónico se asocia con la enfermedad de las arterias coronarias (TxCAD) o el rechazo crónico de un trasplante de riñón.
3. Procedimiento para el diagnóstico y/o pronóstico del rechazo crónico y patologías asociadas, el procedimiento comprende la determinación de la presencia o la cantidad de una proteína, la cual es la proteína ribosomal L7, la β -transducina, 1-TRAF o la lisil-tRNA sintetasa, o un anticuerpo capaz de unirse específicamente a una de las proteínas en una muestra de un paciente.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en donde el rechazo crónico es la enfermedad de las arterias coronarias asociada al trasplante (TxCAD) o el rechazo crónico de un trasplante de riñón.
5. Procedimiento según la reivindicación 3 o la 4, en donde la muestra comprende células endoteliales de un vaso grande o de monocitos.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde el procedimiento comprende las etapas de:
 - (a) contacto de una muestra de un paciente con un soporte sólido en donde se ha inmovilizado un agente de unión que contiene sitios de unión capaces de unir específicamente el anticuerpo o antígeno con una muestra de un paciente en condiciones tales que el anticuerpo o el antígeno se unen al agente de unión: y,
 - (b) determinación de la presencia o la cantidad del anticuerpo o antígeno unido al agente de unión.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en donde la etapa (b) comprende (i) el contacto del soporte sólido con un agente revelador que es capaz de unirse a los sitios de unión ocupados, sitios de unión desocupados o al anticuerpo o al antígeno, el agente revelador comprende un marcaje, e (ii) la detección del marcaje para obtener un valor representativo de la presencia o cantidad del anticuerpo o del antígeno en la muestra.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en donde el marcaje es un marcaje radioactivo, un fluoróforo, un fósforo, un colorante láser, un colorante cromogénico, una partícula coloidal macromolecular, una perla de látex que está coloreada, una molécula magnética o paramagnética, una enzima que cataliza una reacción productora de un resultado detectable o el marcaje es una etiqueta.
9. Procedimiento según la reivindicación 6, en donde en la etapa (b) el analito se marca para permitir su detección cuando está unido al agente de unión.
10. Procedimiento según cualquiera de las siguientes reivindicaciones 3 a 9, en donde el agente de unión que se inmoviliza en el soporte sólido es la proteína ribosomal L7, la β -transducina, 1-TRAF, o la lisil tRNA-sintetasa o los fragmentos de uno de estos antígenos.
11. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en donde el agente de unión que se inmoviliza en el soporte sólido es un anticuerpo que es capaz de unirse a la proteína ribosomal L7, la β -transducina, 1-TRAF, o la lisil t-RNA sintetasa.
12. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, en donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia o la cantidad de diversos marcadores proteicos o anticuerpos asociados con el rechazo crónico en una sola muestra.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, en donde el procedimiento utiliza diversos agentes de unión inmovilizados en localizaciones determinadas sobre el soporte sólido.
14. Procedimiento según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde los marcadores proteicos incluyen la vimentina o los anticuerpos incluyen los anticuerpos anti-vimentina.
15. Equipo para la utilización en el diagnóstico o pronóstico de la enfermedad de las arterias coronarias asociada con el trasplante (TxCAD) o el rechazo de un órgano transplantado mediante la determinación de la presencia o la cantidad de un analito seleccionado a partir de una proteína, la cual es la proteína ribosomal L7, la β -transducina, 1-TRAF, o la lisil t-RNA sintetasa, o un anticuerpo capaz de unirse específicamente a una de estas proteínas en una muestra de un paciente, dicho equipo comprende:

ES 2 281 364 T3

- (a) un soporte sólido que tiene un agente de unión capaz de unirse al analito inmovilizado en él;
- (b) un agente de revelado que comprende un marcaje; y
- (c) uno o más componentes seleccionados de entre el grupo consistente en soluciones de lavado, diluyentes y tampones.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65