



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 244**

51 Int. Cl.:
C12N 5/06 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03730427 .6**
96 Fecha de presentación : **16.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1458853**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.09.2004**

54 Título: **Métodos de ensayo de compatibilidad cruzada específica de donante.**

30 Prioridad: **16.05.2002 US 381033 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.04.2010

73 Titular/es: **Absorber AB.**
Drottninggatan 33, Box 7710
103 95 Stockholm, SE

72 Inventor/es: **Sumitran-Holgersson, Suchitra**

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 337 244 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

Métodos de ensayo de compatibilidad cruzada específica de donante.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un método para el aislamiento directo de células endoteliales a partir de sangre completa, para la detección específica de compatibilidad cruzada específica de donante para detectar anticuerpos anti-células endoteliales previamente al trasplante de un órgano.

10 Antecedentes de la invención

La presencia de anticuerpos específicos de antígeno leucocitario humano (HLA) reactivos con linfocitos humanos se ha asociado antes y/o después del trasplante de aloinjerto renal con rechazos hiperagudos, rechazos agudos tempranos y pobre supervivencia del injerto. Sin embargo, pueden producirse rechazos en ausencia de anticuerpos linfocitotóxicos detectables, sugiriendo que los sistemas antigénicos no HLA también podrían desempeñar un papel en los rechazos del aloinjerto renal hiperagudo y agudo. Los anticuerpos reactivos con células endoteliales y con monocitos (también denominado sistema antigénico EM) o únicamente con células endoteliales, han sido descritos y se ha informado que presentan un efecto deletéreo en varios trasplantes de órganos.

Recientemente, el antígeno cadena A del complejo de histocompatibilidad mayor de clase I (MICA) expresado en células endoteliales ha sido identificado como uno de los antígenos diana de la inmunidad humoral asociada a rechazos irreversibles de aloinjertos renales. Los estudios de aloinjertos procedentes de donante vivo relacionado que presentan HLA idéntico han demostrado que la presencia de anticuerpos reactivos para células endoteliales/monocitos se correlaciona con el rechazo, la pérdida y una función pobre del aloinjerto. Se ha informado que esta reactividad podría ser responsable de hasta un 80% de los rechazos irreversibles en este grupo de pacientes. Sin embargo, la compatibilidad cruzada de linfocitos (LXM) utilizada rutinariamente no permite el ensayo rutinario de anticuerpos clínicamente relevantes de HLA clase I, clase II, reactivos con endotelio y monocitos, y específicos de células endoteliales. Aunque la presencia de células endoteliales circulantes en sangre completa ha sido debatida durante muchos años, algunos investigadores recientemente han informado de la existencia de células endoteliales precursoras circulantes en seres humanos adultos. Sin embargo, en la actualidad no se dispone de ningún método adecuado para llevar a cabo un ensayo rutinario de compatibilidad cruzada específica de donante de células endoteliales (ECXM).

Por lo tanto, existe una necesidad de llevar a cabo eficientemente un ensayo rutinario de compatibilidad cruzada de células endoteliales específica de donante para ayudar a la identificación de mejores combinaciones de donante-receptor, que de esta manera presentarán un mayor impacto sobre la supervivencia del trasplante que el método actual de identificación de compatibilidad cruzada de linfocitos.

F. GEORGE *ET AL.*, THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 67(1):147-153, 1992, se refiere al aislamiento rápido de células endoteliales humanas a partir de sangre completa utilizando anticuerpo monoclonal s-endo1 acoplado a perlas inmunomagnéticas y el daño endotelial tras la angioplastia.

ROSELLA SBARBATI *ET AL.*, BLOOD 77(4), 15 de febrero de 1991 (1991-02-15), páginas 764-769, se refiere a la detección inmunológica de células endoteliales en sangre completa humana.

M.K. JONES *ET AL.*, JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY 51(4):813-820, 2000, se refiere al aislamiento y caracterización de células endoteliales microvasculares gástricas de rata como modelo para el estudio de la angiogénesis gástrica *in vitro*.

MARIO PEICHEV *ET AL.*, BLOOD 95(3):952-958, 1 de febrero de 2000 (2000-02-01) se refiere a la identificación de una población de precursores endoteliales funcionales mediante la expresión de VEGFR-2 y AC133.

Descripción resumida de la invención

La invención se refiere a un método para aislar células endoteliales precursoras que resulten útiles en la identificación de la compatibilidad cruzada específica de donante previamente al trasplante. Las células endoteliales precursoras aisladas también resultan útiles en el diagnóstico de diversos trastornos vasculares y de tipo inmunológico.

La invención incluye un método para aislar una célula endotelial precursora de una muestra biológica mediante la provisión de una muestra que es conocido que contiene, o que se sospecha que contiene, una célula endotelial precursora. La célula endotelial precursora es positiva para Tie-2. La muestra se pone en contacto con un reactivo de detección para formar un complejo de detección de reactivo-célula endotelial. La célula endotelial precursora se aísla mediante la separación del complejo respecto de la muestra. La separación se lleva a cabo, por ejemplo, mediante citometría de flujo o la utilización de un campo magnético.

El reactivo de detección es un anticuerpo específico para Tie-2. El reactivo de detección puede unirse a un soporte sólido, tal como una perla no magnética, magnética o paramagnética.

La muestra biológica es de sangre completa, de suero, de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) o producto de leucoféresis.

La invención proporciona además un método para identificar la compatibilidad cruzada entre un donante y un receptor mediante la provisión de una muestra biológica de un donante que es conocido que contiene células endoteliales precursoras y puesta en contacto de la muestra procedente del donante con reactivo de detección para aislar las células endoteliales precursoras. La falta de reactividad entre la muestra del receptor y la célula endotelial precursora aislada indica compatibilidad entre el donante y el receptor y una probabilidad más alta de que el trasplante de órgano resulte exitoso.

En un aspecto adicional, la invención incluye un método para diagnosticar un trastorno vascular o de tipo inmunológico en un sujeto mediante la provisión de una primera muestra procedente de un sujeto que es conocido que contiene, o que se sospecha que contiene, una célula endotelial precursora. La primera muestra se pone en contacto con una segunda muestra. La segunda muestra procede de un sujeto que es conocido que contiene, o que se sospecha que contiene, un autoanticuerpo. Alternativamente, la segunda muestra contiene reactivos (por ejemplo anticuerpos) que reconocen marcadores de superficie celular endotelial asociados al trastorno particular. Se determina la formación de complejo entre la célula endotelial precursora y la segunda muestra. La presencia del complejo indica la presencia del trastorno en el sujeto.

En todavía otro aspecto, la invención incluye un método para determinar la eficacia del tratamiento o el pronóstico de un trastorno de tipo autoinmunitario o vascular en un sujeto mediante la provisión de una primera muestra procedente de un sujeto que es conocido que contiene, o que se sospecha que contiene, una célula endotelial precursora, la puesta en contacto de la célula endotelial precursora con una segunda muestra procedente de un sujeto que es conocido que contiene, o que se sospecha que contiene, un autoanticuerpo, la medición de cualquier complejo de autoanticuerpo-célula endotelial precursora presente, proporcionando un perfil del sujeto. El perfil del sujeto se compara con un perfil de referencia, de manera que la similitud entre los perfiles del sujeto y de referencia indica que el tratamiento resulta eficaz o que el pronóstico es favorable.

Entre los trastornos de tipo autoinmunitario o vasculares se incluyen la vasculitis, la aterosclerosis, los trastornos hemorrágicos, la angiogénesis, la trombosis, la cicatrización defectuosa de heridas y el trasplante.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado entendido comúnmente por un experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos indicados en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente memoria, incluyendo definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra gráficos de puntos que representan el perfil de dispersión directa y lateral, así como la fluorescencia, de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) teñidas con anticuerpos monoclonales anti-Tie-2+ (MAbs). Las células Tie-2+ (puntos grises) aparecieron en la puerta de los linfocitos. Los histogramas muestran el porcentaje de células Tie-2+ (aproximadamente 2±3%) en PBMCs teñidas con mAbs de control negativo y Tie-2.

Las figuras 2a-c son fotografías de la morfología de células Tie-2+ obtenidas bajo un microscopio óptico en diversos puntos del tiempo tras su aislamiento a partir de sangre periférica. Inicialmente, estas células presentaban una apariencia de células individuales o de agrupaciones de células redondas (a), que tras unos cuantos días de cultivo se convirtieron en células adherentes con un citoplasma extendido (los objetos oscuros son perlas) (b). Tras 7 a 12 días en cultivo, las células desarrollaron gradualmente una forma ahusada (c).

La figura 3a es una serie de fotografías que muestra células Tie-2+ teñidas positivamente para los marcadores asociados a endotelio, lipoproteína de baja densidad acetilada (Ao-LDL), factor de von Willebrand (vWF), receptor-1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1) y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM) (sobre células Tie-2+ activadas). Las células Tie-2+ también expresan constitutivamente el antígeno leucocitario humano de clase I (HLA de clase I) y el marcador CD68 de monocito/macrófago.

La figura 3b muestra que las células Tie-2+ quiescentes expresan cantidades pequeñas de los antígenos clínicamente importantes MICA (gris oscuro) y HLA de clase II (gris claro), y anticuerpos de control (negro).

La figura 4a es un gráfico de puntos que representa la dispersión directa y lateral de rosetas de células Tie-2+ y perlas paramagnéticas (puerta R1), y de perlas paramagnéticas solas (puerta R2).

Las figuras 4a-g son histogramas que muestran que los sueros pro-trasplante procedentes de dos pacientes trasplantados de riñón con rechazos hiperagudos reaccionaron fuertemente con sus células Tie-2+ específicas de donante

respectivas (b y e), mientras que sus fracciones Tie-2, que incluían linfocitos, no reaccionaron (d y g). Los histogramas c y f muestran que las perlas paramagnéticas por sí solas no reaccionaron con los sueros de manera no específica. Las líneas grises representan los sueros de control o negativos, y las líneas negras representan la reactividad con sueros de pacientes.

5

Descripción detallada de la invención

La invención se basa en parte en el descubrimiento de que el reconocimiento de poblaciones celulares específicas individuales permite la detección de anticuerpos clínicamente relevantes específicos de donante, de antígenos leucocitarios humanos (HLA) de clase I, de clase II, reactivos con endotelio y monocitos, y específicos de células endoteliales previamente al trasplante de órganos. La utilización rutinaria del ensayo de compatibilidad cruzada de células endoteliales ayudará a identificar mejores combinaciones de donante-receptor y de esta manera presentará un mayor impacto sobre la supervivencia del trasplante en comparación con los ensayos tradicionales de compatibilidad cruzada de linfocitos.

15

Se ha informado de la importancia clínica de los anticuerpos de células endoteliales (EC) en el alotrasplante. Sin embargo, la falta de un método adecuado para aislar las ECs específicas de donante ha impedido la detección rutinaria de estos anticuerpos previamente al trasplante. La invención proporciona un método rápido y simple para el aislamiento directo de ECs precursoras a partir de sangre completa, para el ensayo rutinario de compatibilidad cruzada para detectar los anticuerpos anti-EC. La presencia de anticuerpos reactivos con células endoteliales se ha detectado anteriormente utilizando líneas de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), líneas celulares de queratinocitos o monocitos como dianas, o mediante inmunohistoquímica. Sin embargo, estos métodos resultan complicados debido a que el cultivo de las células endoteliales es tedioso y resulta necesario generalmente un panel grande de donantes de líneas HUVEC/queratinocitos para representar todos los alelos polimórficos conocidos para el cribado de anticuerpos reactivos con células endoteliales. Además, estos métodos no permiten la detección de anticuerpos de células endoteliales específicos de donante. De esta manera, la utilización de un ensayo de compatibilidad cruzada de células endoteliales resultaría ventajoso en comparación con la utilización del ensayo de compatibilidad cruzada de linfocitos, debido a que la compatibilidad cruzada de linfocitos no permite dicha detección o aislamiento de anticuerpos reactivos con células endoteliales específicos de donante.

30

Se aislaron ECs utilizando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos contra el receptor Tie-2 de angiopoyetina, que se expresa en precursores de EC. Los genes Tie desempeñan un papel importante en el desarrollo vascular renal, y basándose en experimentos de trasplante, se ha demostrado que estos precursores contribuyen a la maduración glomerular. Se llevó a cabo un análisis retrospectivo de 50 sueros de compatibilidad cruzada previamente bien caracterizados obtenidos inmediatamente antes del trasplante de pacientes que presentaban enfermedad renal de último estadio. Las células Tie-2+ expresaban marcadores celulares de HLA de clase I, de clase II, y otros marcadores celulares endoteliales. Los sueros que era conocido que contenían únicamente anticuerpos específicos de EC o reactivos con EC y con monocitos (EM) reaccionaron positivamente con las células Tie-2+, pero no con células Tie-2 procedentes del mismo individuo. Además, las células Tie-2+ reaccionaron con sueros que contenían únicamente Abs de HLA de clase I o de clase II. En total, 3/25 de los sueros de pacientes con un resultado de injertación estable y sin rechazos reaccionaron con las células Tie-2+. Esta interacción de antígeno-anticuerpo resulta relevante para la patogénesis del rechazo, debido a que en muchos estudios estos anticuerpos no se detectan en el suero de los pacientes con buena función del injerto o en pacientes no trasplantados.

Métodos de aislamiento de células endoteliales precursoras

La invención incluye métodos para aislar células endoteliales precursoras a partir de una mezcla de células mediante la puesta en contacto de la mezcla de células con un reactivo de detección para formar un complejo de célula endotelial-reactivo de detección. El complejo se forma mediante una interacción de afinidad específica entre el reactivo de detección y la célula. El complejo se separa de la mezcla para aislar la célula endotelial precursora. El complejo se separa de la mezcla utilizando procedimientos conocidos de la técnica, tales como, por ejemplo, cromatografía líquida (por ejemplo HPLC o FPLC), cromatografía de membrana de alto rendimiento (HPMC), citometría de flujo o la utilización de un campo magnético. Alternativamente, el complejo se separa de la mezcla mediante la unión del reactivo de detección a un soporte sólido. Puede utilizarse una etapa de lavado mediante la resuspensión del complejo en una solución biológicamente compatible. El complejo puede resuspenderse, es decir, lavarse, tantas veces como se desee. Típicamente las partículas se lavan tres veces. Una solución biológicamente compatible incluye tampones biológicos conocidos de la técnica, tales como solución salina tamponada con fosfato (PBS).

El reactivo de detección es un anticuerpo específico para Tie-2. El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal. El término "anticuerpo" comprende no sólo un anticuerpo intacto, sino también un fragmento de anticuerpo inmunológicamente activo, por ejemplo un fragmento Fab o (Fab)₂, una molécula monocatenaria Fv manipulada, o una molécula quimérica, por ejemplo un anticuerpo que contiene la especificidad de unión de un anticuerpo, por ejemplo de origen murino, y las partes restantes de otro anticuerpo, por ejemplo de origen humano. Por ejemplo, el reactivo de detección es el anticuerpo monoclonal Tie-2.

65

El reactivo de detección puede unirse a un soporte sólido. El soporte sólido es una partícula, un polímero (por ejemplo poliestireno, polietileno), un recipiente, una cámara, una tira, perlas, partículas, membranas (por ejemplo de nilón, nitrocelulosa o difluoruro de polivinilideno (PVDF)), u otras formas conocidas de la técnica.

ES 2 337 244 T3

El soporte sólido puede portar grupos funcionales, tales como grupos hidroxilo, carboxilo, aldehído o amino. El soporte sólido puede encontrarse cargado positivamente, negativamente o ser hidrofóbico. Pueden prepararse soportes recubiertos funcionalizados para la utilización en la presente invención mediante la modificación del soporte. Por ejemplo, un soporte no recubierto se trata con un polímero que porta uno de dichos grupos funcionales, tal como poliuretano, conjuntamente con un poliglicol para proporcionar grupos hidroxilo, o un derivado de celulosa para proporcionar grupos hidroxilo, un polímero o un copolímero de ácido acrílico o ácido metacrílico para proporcionar grupos carboxilo o un polímero aminoalquilado para proporcionar grupos amino. La patente US No. 4.654.267 describe la aplicación de muchos recubrimientos superficiales.

La partícula está realizada en compuestos metálicos, sílice, látex, material polimérico o un núcleo de sílice, látex o polímero recubierto con un metal o compuesto metálico. Preferentemente la partícula se realiza en un compuesto metálico, tal como hierro, gadolinio, zinc, indio, oro, plata, cobalto, cobre o magnesio. Más preferentemente, la partícula es magnetizable o magnética. La expresión "magnetizable o magnética" se refiere a que la partícula es capaz de presentar un momento magnético al introducirla en un campo magnético.

El reactivo de detección se marca con un marcador detectable. Por ejemplo, el reactivo de detección se marca con un isótopo radioactivo (por ejemplo ^{125}I y ^{131}I), enzimas (por ejemplo peroxidasa, beta-galactosidasa, fosfatasa alcalina) o sustancias fluorescentes (por ejemplo isotiocianato de fluoresceína (FITC)). Los marcajes se cuantifican mediante los métodos convencionales bien conocidos de la técnica, cuantificando de esta manera el complejo inmunológico formado. La mezcla de células es cualquier muestra que es conocido que contiene, o que se sospecha que contiene, células endoteliales. Por ejemplo, la mezcla es una muestra biológica, tal como de sangre completa, suero, producto de leucoféresis, médula ósea, células mononucleares de sangre periférica o un homogenado de tejido.

Una célula endotelial es cualquier célula derivada de cualquier parte del árbol vascular. Por ejemplo, las células endoteliales proceden de venas grandes y pequeñas, de capilares arteriales, de la vena umbilical de bebés recién nacidos, de vasos sanguíneos cerebrales o de tumores sólidos vascularizados. La célula endotelial es una célula endotelial precursora que es positiva para Tie-2.

Métodos de ensayo de compatibilidad cruzada específica de donante

La compatibilidad cruzada detecta aquellas diferencias antigénicas a las que el receptor ya se encuentra sensibilizado. Se realiza un ensayo de compatibilidad cruzada de un donante con un receptor mediante la puesta en contacto de una muestra del donante con un reactivo de detección para aislar una célula endotelial precursora. La muestra del receptor se pone en contacto con la célula endotelial precursora aislada y se determina la reactividad de la muestra del receptor con la célula endotelial precursora aislada. El término "reactividad" se refiere a que se forma un complejo mediante una interacción de afinidad específica entre la muestra del receptor y la célula. La falta de reactividad de la muestra del receptor con la célula endotelial precursora aislada indica compatibilidad entre el donante y la muestra del receptor. En contraste, la reactividad de la muestra del receptor con la célula endotelial precursora aislada indica no compatibilidad entre el donante y la muestra del receptor. La compatibilidad se mide a partir de la falta o nivel reducido de rechazo hiperagudo del trasplante procedente del donante en el receptor.

El donante y el receptor son, por ejemplo, cualquier mamífero, por ejemplo un ser humano, un cerdo, una vaca o un caballo. El donante y el receptor son de la misma especie. Alternativamente, el donante y el receptor son de diferente especie.

Las muestras del donante y del receptor son, por ejemplo, sangre completa, suero, producto de leucoféresis, médula ósea, células mononucleares sanguíneas periféricas o un homogenado de tejido. Opcionalmente, las muestras se someten a una etapa de prepurificación previamente al ensayo de compatibilidad cruzada.

La reactividad se determina mediante métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, la reactividad se mide mediante un ensayo ELISA, citometría de flujo (por ejemplo compatibilidad cruzada por citometría de flujo) o compatibilidad cruzada por linfotoxicidad dependiente del complemento.

Trastornos vasculares e inmunológicos

La invención también proporciona métodos de diagnóstico, de acceso al pronóstico o de monitorización del curso de tratamiento de trastornos vasculares y autoinmunológicos.

En estos métodos se proporciona una primera muestra de ensayo procedente de un sujeto. La muestra es conocido que contiene, o se sospecha que contiene, una célula endotelial precursora. Opcionalmente la célula endotelial precursora se aísla de la primera muestra.

Se diagnostica un trastorno autoinmunológico mediante la puesta en contacto de la primera muestra con una segunda muestra procedente del sujeto que es conocido que contiene, o que se sospecha que contiene, un autoanticuerpo, y la identificación de un complejo de autoanticuerpo-célula endotelial precursora. La presencia de un complejo de autoanticuerpo-célula endotelial precursora indica que el sujeto sufre un trastorno autoinmunológico o está predispuesto a sufrirlo. En contraste, la ausencia de un complejo de autoanticuerpo-célula endotelial precursora indica que el sujeto no sufre un trastorno autoinmunológico o que está predispuesto a sufrirlo.

Un trastorno vascular se diagnostica mediante la puesta en contacto de la primera muestra con una segunda muestra. La segunda muestra se deriva del sujeto. Alternativamente, la segunda muestra comprende anticuerpos de superficie celular que es conocido que se encuentran asociados a un trastorno vascular particular. La presencia de un complejo de segunda muestra-célula endotelial precursora indica que el sujeto sufre un trastorno vascular o que está predispuesto a sufrirlo. En contraste, la ausencia de un complejo de segunda muestra-célula endotelial precursora indica que el sujeto no sufre un trastorno vascular o que no está predispuesto a sufrirlo.

Los métodos permiten la monitorización del curso de tratamiento de un trastorno vascular o de tipo autoinmunitivo o la determinación del pronóstico del sujeto. En este método, se proporciona muestra de ensayo procedente de un sujeto sometido a tratamiento para el trastorno. Si se desea, las muestras de ensayo se obtienen del sujeto en diversos puntos del tiempo antes, durante o después del tratamiento. Seguidamente se determina la presencia de un complejo de célula endotelial precursora para crear un perfil del sujeto. El perfil del sujeto se compara con un perfil de referencia cuyo estado de trastorno vascular o de trastorno autoinmunitivo es conocido. El perfil de referencia no ha sido expuesto al tratamiento. El perfil de referencia se deriva de un tipo de muestra similar al de la muestra de ensayo. Opcionalmente, el perfil de referencia se deriva de una base de datos de información molecular derivada de muestras para las que es conocido el parámetro o condición sometido a ensayo.

En el caso de que el perfil de referencia no contenga complejos de autoanticuerpo-célula endotelial precursora, una similitud entre la cantidad de complejos entre los perfiles del sujeto y de referencia indica que el tratamiento resulta eficaz (por ejemplo que se alivia uno o más síntomas del trastorno inmunitivo o que se reduce la severidad del trastorno) y, de esta manera, indica un pronóstico favorable para el sujeto. Sin embargo, un cambio de la cantidad de complejos entre el perfil del sujeto y el perfil de referencia indica que el tratamiento no resulta eficaz y, de esta manera, indica un pronóstico desfavorable para el sujeto.

En el caso de que el perfil de referencia contenga complejos de autoanticuerpo-célula endotelial precursora, por ejemplo en el caso de que el perfil de referencia incluya complejos obtenidos del sujeto en el momento del diagnóstico aunque antes de iniciar el tratamiento, una similitud entre los patrones de expresión de complejos en los perfiles del sujeto y de referencia indica que el tratamiento no resulta eficaz. En contraste, un cambio de los complejos de expresión en el perfil del sujeto y de este perfil de referencia indica que el tratamiento resulta eficaz.

El término “eficaz” se refiere a que el tratamiento conduce a una reducción de cualquiera de los síntomas anteriormente observados de un trastorno autoinmunitivo en un sujeto. En el caso de que el tratamiento se aplique profilácticamente, el término “eficaz” se refiere a que el tratamiento retrasa o evita un trastorno de tipo autoinmunitivo o vascular.

La expresión “trastorno autoinmunitivo” incluye trastornos mediados por un mecanismo inmunitivo, tal como la deposición de complejos inmunitivos, la inflamación, el ataque directo por anticuerpos circulantes. Un trastorno autoinmunitivo o un trastorno de tipo autoinmunitivo incluye aquellos trastornos causados por una respuesta inmunitiva contra los propios tejidos corporales. Los trastornos autoinmunitivos resultan en la destrucción de uno o más tipos de tejido corporal, el crecimiento anormal de un órgano o cambios de la función orgánica. El trastorno puede afectar únicamente un órgano o tipo de tejido o puede afectar múltiples órganos y tejidos. Entre los órganos y tejidos afectados comúnmente por trastornos autoinmunitivos se incluye componentes sanguíneos, tales como glóbulos rojos, vasos sanguíneos, tejidos conectivos, glándulas endocrinas, tales como el tiroides o el páncreas, músculos, articulaciones y piel. Entre los trastornos autoinmunitivos se incluyen, por ejemplo, la anemia hemolítica autoinmunitiva, la hepatitis autoinmunitiva, la enfermedad de Berger, el síndrome de fatiga crónica, la enfermedad de Crohn, la tiroiditis de Hashimoto, la fibromialgia, el lupus sistémico eritematoso, la enfermedad de Graves, la trombocitopenia púrpura idiopática, la esclerosis múltiple, la soriasis, la fiebre reumática y la artritis reumatoide.

Entre los trastornos vasculares se incluyen las enfermedades asociadas al sistema vascular. Por ejemplo, la vasculitis, la aterosclerosis, los trastornos hemorrágicos y la cicatrización defectuosa de heridas.

Los síntomas de un trastorno autoinmunitivo dependen de la enfermedad específica y del órgano o tejido que resulta afectado. Por ejemplo, el lupus eritematoso sistémico puede provocar insuficiencia renal, artritis y una erupción cutánea en la cara. La anemia hemolítica autoinmunitiva causa anemia o recuentos bajos de glóbulos rojos. Entre los síntomas generales de los trastornos autoinmunitivos se incluyen: la febrícula, el malestar, que es una vaga sensación de encontrarse enfermo, la fatiga o el cansancio fácil. Los trastornos autoinmunitivos se diagnostican basándose en síntomas, en un examen físico y en los resultados de los análisis de sangre.

Entre los tratamientos para reducir los síntomas se incluyen: fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), incluyendo la aspirina y el ibuprofeno, para aliviar la fiebre, el dolor articular y los dolores musculares, y los corticosteroides, o esteroides, para ayudar a reducir la inflamación. Estas medicaciones con frecuencia se utilizan a corto plazo, para que el paciente supere un episodio súbito o una recaída; las medicaciones para suprimir el sistema inmunitivo, tales como el metotrexato, la azatioprina y la ciclofosfamida, ayudan a reducir la inflamación y el daño a los órganos. En algunos casos pueden resultar necesarios otros tratamientos. Por ejemplo, puede resultar necesaria la cirugía para el bloqueo de los intestinos, que puede producirse en la enfermedad de Crohn. Pueden resultar necesarias transfusiones de sangre en casos severos de anemia hemolítica autoinmunitiva. La insulina se administra en individuos que presentan diabetes de tipo 1 para controlar los niveles de glucosa en sangre.

ES 2 337 244 T3

El sujeto preferentemente es un mamífero. El mamífero puede ser, por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo o una vaca.

Métodos generales

5

Los datos descritos en la presente memoria se generaron utilizando los reactivos y métodos siguientes.

Ejemplo 1

10 *Acoplamiento de MAbs anti-Tie-2 a perlas magnéticas*

En primer lugar se acoplaron Abs monoclonales (MAbs) humanos anti-Tie-2 (BD Pharmingen, Oxford, Reino Unido) a perlas Dynabeads pan-mouse con un línker de ADN (nº de cat. 115.19) (DynaL, Oslo, Noruega). Para este fin, se añadieron 10 µg de MAbs Tie-2 a 500 µl de perlas Dynabeads pan-mouse. Se mezcló la suspensión de perlas-MAbs por cabeceo y rotación (agitador "Rock n' roller") durante 24 horas a 4°C. Se eliminó el exceso de MAb y las perlas recubiertas con MAb Tie-2 se bloquearon con 2 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1% en un agitador rock n' roller a 4°C durante 10 minutos. Se repitió la etapa de bloqueo seis veces, después de lo cual las perlas se resuspendieron en el volumen original (500 µl) de PBS/BSA al 0,1%.

20

Ejemplo 2

25 *Aislamiento de células Tie-2+ a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)*

25

Debido al gran número de células requerido para establecer la especificidad de las células Tie-2+, en los experimentos iniciales se aislaron PBMCs a partir de producto de leucoféresis de donantes de sangre sanos mediante centrifugación en gradiente en solución Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Noruega). Se aislaron ECs a partir de PBMCs utilizando perlas magnéticas recubiertas con anti-MAb Tie-2. En primer lugar las PBMCs se distribuyeron en varios tubos, conteniendo cada tubo 40x10⁶ células. Se añadieron a cada tubo 15 µl de perlas magnéticas precubiertas con Tie-2 y se incubaron en un volumen de 500 µl de medio RPMI (GIBCO, Paisley, Reino Unido) suplementado con L-glutamina 2 mM y suero de feto bovino inactivado por calor al 10%. Se incubaron células+perlas en un agitador rock n' roller a 4°C durante 30 minutos. Se separaron las células Tie-2+ tras un lavado extensivo (5 a 6 veces) con PBS utilizando un imán. Las células Tie-2+ de todos los tubos se agruparon y se realizó un recuento de las rosetas con un microscopio óptico.

35

Ejemplo 3

40 *Aislamiento de células Tie-2+ directamente a partir de sangre periférica*

Se obtuvieron 40 ml de sangre heparinizada de donantes sanos normales. La sangre se lavó una vez de la manera siguiente: se diluyeron 10 ml de sangre con 40 ml de PBS/BSA al 0,1%. La sangre se centrifugó a 800xg durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células sanguíneas se resuspendieron en 10 ml de PBS que contenía 0,6% de citrato sódico. Se añadieron 50 µl de perlas magnéticas recubiertas de MAbs Tie-2 a cada tubo y se incubaron durante 30 minutos a 4°C en un agitador rock n' roller. Las células Tie-2+ se recogieron con un imán y se lavaron una vez con PBS-citrato sódico. Tras 4 a 5 lavados con PBS, se recogieron células Tie-2+ y la concentración de las células se ajustó a aproximadamente 3-4x10⁶ células/ml. Estas células circundadas por perlas se utilizaron en un ensayo de microcitotoxicidad o en un citómetro de flujo.

50

Ejemplo 4

55 *Inmunocitoquímica*

55

Las MAbs utilizadas para la inmunocitoquímica y el análisis FACS se proporcionan en la Tabla 1. Las células Tie-2+ obtenidas a partir de producto de leucoféresis de voluntarios normales proporcionó un número suficiente de células para llevar a cabo diversos análisis inmunocitoquímicos. Las células Tie-2+ se cultivaron en placas de cultivo de tejidos recubiertas de fibronectina. Se dejó que las células se engancharan (24 horas) previamente a la tinción para diversos marcadores específicos de ECs. Las células se dejaron sin tratar o se estimularon con TNF-α e IFN-γ durante 14 horas. Para la inmunocitoquímica, las células se fijaron utilizando acetona al 30% en metanol durante 1 minuto. Tras dos lavados con PBS, las células se bloquearon utilizando albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos primarios anteriormente indicados diluidos 1:100 (en PBS) a 4°C durante 2 horas. El anticuerpo secundario era una IgG de cabra antiratón conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluido 1:500 (en PBS). Tras incubar durante 1 hora a 4°C, las células se lavaron dos veces y se analizaron bajo un microscopio de fluorescencia.

65

Ejemplo 5

Ensayo de citometría de flujo para la detección de anticuerpos anti-células endoteliales

5 Se estudió un total de 50 sueros de pacientes trasplantados de riñón. Durante los últimos años (1988-2001) se han caracterizado meticulosamente los sueros pretrasplante procedentes de pacientes de riñón utilizando diversos métodos, para la presencia de anticuerpos específicos de tipos celulares, reactivos contra endotelio y monocitos y contra HLA que se ha descubierto que se encuentran asociados a rechazos. Durante dichos años, se recogieron 15 sueros pretrasplante, caracterizados porque presentaban anticuerpos anti-EM o específicos de EC procedentes de pacientes no aloinmunizados con rechazos.

15 Los métodos generales descritos en la presente invención se basan en dichos 15 sueros. La caracterización anterior demostró que diez sueros proporcionaron reacciones positivas en líneas humanas de células endoteliales de la vena umbilical (HUVECs) y en monocitos (Tabla 2, puntos nº 1 a 10) y cinco sueros con únicamente ECs (Tabla 2, puntos nº 11 a 15). Debido a que ninguno de los quince pacientes con anticuerpos específicos de EM o de EC había sido aloinmunizados, no se encontraron aloanticuerpos HLA detectables en estos sueros. Además, se seleccionaron diez sueros bien caracterizados procedentes de pacientes aloinmunizados que es conocido que contienen aloanticuerpos HLA de únicamente clase I o de únicamente clase II (Tabla 2). Como controles también se sometieron a ensayo 25 sueros de pacientes sin rechazos de injerto.

20 Mediante la utilización de dichos sueros se determinó si las células Tie-2+ aisladas podían ser dianas adecuadas para la detección de anticuerpos clínicamente relevantes en el trasplante de riñón. Se utilizó como control positivo un grupo de sueros procedentes de pacientes que habían formado aloanticuerpos como resultado de múltiples transfusiones de sangre o trasplantes de órgano. Los sueros procedentes de varones de grupo sanguíneo AB no transfundidos y sanos sirvieron como controles negativos. Se utilizaron los anticuerpos siguientes: fragmentos F(ab')₂ conjugados con FITC de cabra anti-IgG humana (específicos de Fc) o IgM (Immunotech, USA). Para el ECXM por citometría de flujo se utilizaron 100.000 células Tie-2+ acopladas a perlas y se llevó a cabo el procedimiento tal como se ha descrito anteriormente. Las células se analizaron en un citómetro de flujo Becton-Dickinson (FACS sorter). Un desplazamiento de la fluorescencia promedio de 10 canales en la muestra de ensayo respecto al control negativo se consideró un desplazamiento positivo, determinado tal como se ha indicado anteriormente. Este valor es arbitrario y debería determinarse en cada laboratorio de trasplante. Las células Tie-2+ también se utilizaron en el ensayo rutinario de microcitotoxicidad inmunológico-magnético tal como se han descrito otros autores. Además, las células Tie-2+ inmediatamente después del aislamiento se sometieron a ensayo en el citómetro de flujo para todos los marcadores superficiales de las células endoteliales (Tabla 1).

35

Ejemplo 6

Inmunocitoquímica y análisis FACS de marcadores de células endoteliales en células Tie-2+ aisladas

40 Se aislaron ECs Tie-2+ a partir de sangre periférica humana mediante la selección de perlas magnéticas. El análisis FACS demostró que aproximadamente 3±4% de las PBMCs eran Tie-2+ (fig. 1). Tras 24 horas de cultivo, la mayoría de las células Tie-2+ se engancharon a las placas de 24 pocillos recubiertas de fibronectina y se convirtieron en adherentes. Inicialmente estas células se encontraban en forma de células individuales o de agrupaciones de células redondas que, tras unos cuantos días de cultivo, se convirtieron en células adherentes con citoplasma extendido. Tras 4 días de cultivo, las células desarrollaron gradualmente una forma ahusada (fig. 2a-c).

50 La figura 3 y la Tabla 1 resumen los resultados de los análisis inmunocitoquímicos con anticuerpos contra antígenos conocidos de células endoteliales. Ya en las 0 horas, el análisis FACS indicaba que las células Tie-2+ expresaban el receptor de acLDL, vWF, VEGFR-1 y presentaban una expresión fuerte de los antígenos HLA de clases I y II. Resulta importante que las células expresaron el clínicamente importante antígeno MICA, aunque débilmente. Tras la activación con citoquinas, las células expresaron las moléculas de adhesión específicas de células endoteliales CD62 E (selectina E) y CD106 (VCAM), y mostraron una expresión incrementada de HLA de clase II. De esta manera, tanto el análisis inmunohistoquímico como el análisis FACS indicaban que las células Tie-2+ expresan la mayoría de los marcadores de las células endoteliales.

55

Ejemplo 7

Detección de anticuerpos reactivos anti-células endoteliales

60 De media pueden obtenerse aproximadamente 3±4x10⁴ células Tie-2+/10⁶ PBMCs a partir de donantes individuales. Debido a que en la presente invención se analizó un gran número de sueros, se aislaron células Tie-2+ de producto de leucoféresis procedente de donantes de sangre sanos. Los resultados se muestran en la Tabla 2. La totalidad de los 10 sueros que es conocido que presentan anticuerpos contra endotelio y monocitos, y 5 sueros con anticuerpos específicos de células endoteliales mostraron patrones variables de reactividad con el panel de células Tie-2+ de seis donantes diferentes. Sin embargo, las fracciones Tie-2, que incluían linfocitos de los mismos donantes, no reaccionaron con ninguno de los sueros. El patrón de reactividad con el panel de células Tie-2+ de los anticuerpos contra

ES 2 337 244 T3

endotelio-monocitos y de los anticuerpos específicos de células endoteliales, tal como se aprecia en la Tabla 2, indica la existencia de polimorfismo en estos sistemas antigénicos o, alternativamente, la presencia de anticuerpos con diversas especificidades.

5 Los sueros que es conocido que contienen únicamente aloanticuerpos HIT de clase I ampliamente reactivos también proporcionaron reacciones positivas en cada caso con células Tie-2+ procedentes de donantes individuales. La reactividad de los aloanticuerpos de HLA de clase II (especificidades limitadas) también se observó con células Tie-2+ no estimuladas. De los sueros de pacientes de control sin rechazos y con funciones estables del injerto, 3/25 (12%) mostraron reacciones positivas con cuatro de los donantes del panel de Tie-2 (Tabla 2). Los resultados obtenidos en el
10 ensayo de microcitotoxicidad inmunológico-magnético concordaban con los del análisis de citometría de flujo (Tabla 3).

Ejemplo 8

15

Compatibilidad cruzada de células endoteliales específica de donante

Se llevaron a cabo retrospectivamente ensayos de compatibilidad cruzada de células endoteliales específica de donante en dos casos en los que se encontraban disponibles células mononucleares de sangre periférica congelada de donante. Los primeros injertos de riñón de ambos pacientes se perdieron en rechazos hiperagudos en ausencia de anticuerpos demostrables de HLA específicos de donante. Se había caracterizado por completo anteriormente los sueros de compatibilidad cruzada de uno de dichos pacientes como presentando anticuerpos específicos anti-células endoteliales utilizando HUVECs.

25 En este caso, se aislaron células Tie-2+ de las células mononucleares de sangre periférica del primer donante (padre) de este paciente (punto nº 11, Tabla 2) y se mantuvieron bajo congelación en N₂ líquido. Se llevó a cabo retrospectivamente un ensayo de compatibilidad cruzada con el suero del paciente obtenido inmediatamente antes del primer trasplante. Se muestran los resultados en la figura 4b-d. Los resultados de un segundo caso (punto nº 12, Tabla 2) son muy similares a los del punto nº 11, y se muestran en las figuras 4e-g. Tal como puede observarse en la Tabla
30 2, los sueros de ambos puntos proporcionaron un patrón de reactividad similar con el panel de células Tie-2+. No se observó reactividad con las fracciones de Tie-2.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

TABLA 1

Anticuerpos utilizados en la tinción inmunocitoquímica y el análisis de citometría de flujo de células Tie-2+ aisladas a partir de sangre completa			
Anticuerpos	Compañía	Inmunocitoquímica	FACS
CD1a	Becton Dickinson (BD)-USA	-	-
CD3	BD	-	-
CD14	BD	(+)/+	(+)/+
CD19	BD	-	-
CD31	BD	-	-
CD34	BD	-	-
CD56+16	BD	-	-
CD68	BD	++	++
CD83	BD	-	-
CD62E (anti-selectina E)	Biogenesis-UK	+	+
CD106 (anti-VCAM)	Biogenesis-UK	+++	+++
CD54 (anti-ICAM)	R&D Systems-UK	+	+
VWF	SEROTEK-UK	++	++
Ac-LDL	Molecular Probes, Inc.-USA	+++	+++
VEGF-R1 (Flt-1)	R&D Systems	+++	+++
MHC clase I	Serotec-UK	+++	+++
MHC clase II	Serotec-UK	+	++
MICA	Dr. Thomas Spies	(+)/+	(+)/+
Anti-fibroblastos	Serotec-UK	-	-
Anti-actina α	Boehringer Mannheim, Alemania	-	-

(+): tinción débil o inconsistente; +: tinción moderada; ++: tinción fuerte; +++: tinción muy fuerte; vWF: factor de von Willebrand; Ac-LDL: lipoproteína de baja densidad acetilada; MICA: cadena A relacionada con el complejo de histocompatibilidad mayor de clase I.
*expresado en células Tie-2+ únicamente tras la activación con TNF-alfa e IFN-gamma durante 12 a 14 horas.

TABLA 2

Análisis de citometría de flujo de anticuerpos anti-endotelio-monocitos, específicos de endotelio y específicos de HLA de clase I o de clase II con un panel de células Tie-2+						
Punto nº	Donante 1 Tie2+/Tie2-	Donante 2 Tie2+/Tie2-	Donante 3 Tie2+/Tie2-	Donante 4 Tie2+/Tie2-	Donante 5 Tie2+/Tie2-	Donante 6 Tie2+/Tie2-
Sueros que es conocido que contienen Abs reactivos con EMs						
1	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
2	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
3	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
4	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-
5	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-
6	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-
7	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-
8	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-
9	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-
10	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-
Sueros que es conocido que contienen únicamente Abs específicos de ECs						
11	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-
12	+/-	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-
13	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-
14	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-
15	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-
Sueros que es conocido que contienen únicamente Abs ampliamente reactivos con HLA de clase I (n=5)						
16	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Sueros que es conocido que contienen únicamente Abs de HLA clase II (n=5)						
17	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
Sueros de control de puntos con función estable del injerto (n=25)						
18	-/-*	-/-	-/-*	-/-	-/-	-/-*
*3/25 (12%) de los sueros reaccionaron con algunas de las células Tie-2 en el panel						

TABLA 3

Reactividad de anticuerpos anti-endotelio-monocitos, específicos de endotelio y específicos de HLA clase I o clase II con un panel de células Tie-2+ utilizando el ensayo de microcitotoxicidad						
Punto nº	Donante 1 Tie2+/Tie2-	Donante 2 Tie2+/Tie2-	Donante 3 Tie2+/Tie2-	Donante 4 Tie2+/Tie2-	Donante 5 Tie2+/Tie2-	Donante 6 Tie2+/Tie2-
Sueros que es conocido que contienen Abs reactivos con EMs						
1	++/-	+++/-	++/-	++/-	++/-	+++/-
2	++/-	+/-	+++/-	++/-	+++/-	++/-
3	+++/-	++/-	++/-	++/-	++/-	++/-
4	+++/-	-/-	-/-	+++/-	-/-	+++/-
5	-/-	++/-	++/-	++/-	++/-	-/-
6	-/-	++/-	++/-	++/-	++/-	-/-
7	-/-	++/-	++/-	++/-	++/-	-/-
8	-/-	-/-	-/-	++/-	-/-	++/-
9	+++/-	++/-	-/-	-/-	++/-	-/-
10	++/-	++/-	-/-	-/-	++/-	-/-
Sueros que es conocido que contienen únicamente Abs específicos de ECs						
11	+++/-	++/-	-/-	+++/-	-/-	-/-
12	++/-	+++/-	-/-	++/-	-/-	-/-
13	-/-	-/-	++/-	-/-	++/-	++/-
14	-/-	-/-	++/-	-/-	++/-	++/-
15	-/-	-/-	++/-	-/-	++/-	++/-
Sueros que es conocido que contienen únicamente Abs ampliamente reactivos con HLA de clase I (n=5)						
16	+++/>+++	+++/>+++	++++/>++++	+++/>+++	+++/>+++	+++/>+++
Sueros que es conocido que contienen únicamente Abs de HLA clase II (n=5)						
17	+++/>+++	-/-	-/-	+++/>+++	-/-	+++/>+++
Sueros de control de puntos con función estable del injerto (n=25)						
18	-/*	-/-	-/*	-/-	-/-	-/-
*2/25 (8%) de los sueros reaccionaron con algunas de las células Tie-2 en el panel. -: negativo; +: 10% a 25%; ++: 26% a 50%; +++: 51% a 75%; ++++: 76% a 100% de células muertas.						

Referencias

Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Posborg-Petersen V, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 1966; 2: 662.

Ting A. Positive crossmatches-when is it safe to transplant? *Transplant Int.* 1989; 2: 2.

Sumitran-Karuppan S. The clinical importance of choosing the right assay for detection of HLA-specific donor-reactive antibodies. *Transplantation* 1999; 68: 502.

Chapman JR, Taylor CJ, Ting A, Morris PJ. Immunoglobulin class and specificity of antibodies causing positive T cell crossmatches. Relationship to renal transplant outcome. *Transplantation* 1989; 42: 608.

Brasile L, Rodman E, Shield CFd, Clarke J, Cerilli J. The association of antivascular endothelial cell antibody with hyperacute rejection: a case report. *Surgery* 1986; 99: 637.

Sumitran-Karuppan S, Tyden G, Reinholt F, Berg U, Moller E. Hyperacute rejections of two consecutive renal allografts and early loss of the third transplant caused by non-HLA antibodies specific for endothelial cells. *Transplant Immunol.* 1997; 5: 321.

5 **Cerilli J, Brasile L** Endothelial cell alloantigens. *Transplant. Proc.* 1980; 12 (3 Suppl 1): 37.

Stastny P. Endothelial-monocyte antigens. *Transplant. Proc.* 1980; 12 (3 Suppl 1): 32.

10 **Pierce JC, Waller M, Phibbs M.** A mixed antiglobulin test with kidney cells in suspension for IgG antibody in human allograft recipients. *Transplantation* 1975; 19: 343.

Wilson CB. Individual and strain differences in renal basement membrane antigens. *Transplant. Proc.* 1980; 12 (3 Suppl 1): 69.

15 **Paul LC, Carpenter CB.** Antibodies against renal endothelial alloantigens. *Transplant Proc.* 1980; 12 (3 Suppl 1): 43.

20 **Mohanakumar T, Waldrep JC, Phibbs M, Mendez-Picon G, Kaplan AM, Lee HM.** Serological characterization of antibodies eluted from chronically rejected human renal allografts. *Transplantation* 1981; 32: 61.

Hosenpud JD, Everett JP, Morris TE, Mauck KA, Shipley GD, Wagner CR. Cardiac allograft vasculopathy. Association with cell-mediated but not humoral alloimmunity to donor-specific vascular endothelium. *Circulation* 1995; 92: 205.

25 **Perrey C, Brenchley PE, Johnson RW, Martin S.** An association between antibodies specific for endothelial cells and renal transplant failure. *Transplant Immunol.* 1998; 6: 101.

30 **Kalil J, Guilherme L, Neumann J, et al.** Humoral rejection in two HLA identical living related donor kidney transplants. *Transplant. Proc.* 1989; 21 (1 Pt 1): 711.

Sumitran-Holgersson S, Wilczek H, Holgersson J and Söderström K: Identification of the non-classical HLA molecules, MICA, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejections of kidney allografts. Accepted. *Transplantation.*

35 **Cerilli J, Bay W, Brasile L:** The significance of the monocyte crossmatch in recipients of living-related HLA identical kidney graft. *Hum Immunol.* 1983; 7: 45.

40 **Ianhez L, Saldanha LB, Paula FJ et al:** Humoral rejection with negative crossmatches. *Transplant Proc.* 1989; 21: 720.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964.

45 **Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D et al.** Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952.

Vartdal F, Gaudemack G, Funderud S, Brattie A, Lea T, Ugerstad S and Thorsby E: HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation- a fast and reliable technique. *Tissue Antigens* 1986; 28: 301.

50 **Sumitran-Karuppan S, Lindholm A, Möller E:** Fewer acute rejection episodes and improved outcome in kidney transplanted patients with changed selection of criteria based on cross-matching? *Transplantation* 1992; 53: 666.

55 **Sumitran-Karuppan S, Moller E:** Specific inhibition of HLA class I and II antibodies by soluble antigens- A method for the identification of antibody specificity in sera from alloimmunized individuals. *Transplantation* 1994; 58: 713.

60 **Sumitran-Karuppan S, Moller E.** The use of magnetic beads coated with soluble HLA class I or class II proteins in antibody screening and for specificity determinations of donorreactive antibodies. *Transplantation* 1996; 61: 1539.

Moraes JR, Moraes ME, Luo Y, Stastny P: Alloantibodies against donor epidermis and early kidney transplant rejection. *Transplantation* 1991; 51: 370.

65 **Schnurch H, Risau W.** Expression of Tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development* 1993; 119: 957.

Woolf AS, Yuan HT. Angiopoietin growth factors and Tie receptor tyrosine kinases in renal vascular development. *Pediatr Nephrol.* 2001; 16: 177.

ES 2 337 244 T3

REIVINDICACIONES

1. Método para el aislamiento de una célula endotelial precursora a partir de una muestra biológica, que comprende:

- 5 (a) la puesta en contacto de una muestra que contiene, o que se sospecha que contiene una célula endotelial precursora, con un reactivo de detección para formar un complejo de reactivo de detección-célula endotelial precursora, y
- 10 (b) separar el complejo de reactivo de detección-célula endotelial precursora de la muestra biológica, aislando de esta manera la célula endotelial precursora,

en el que el reactivo de detección es un anticuerpo específico contra Tie-2, y

15 en el que la célula endotelial precursora es negativa para CD34.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra se selecciona de entre el grupo que consiste de sangre completa, suero, células mononucleares de sangre periférica y producto de leucoféresis.

20 3. Método según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une a un soporte sólido.

4. Método según la reivindicación 3, en el que el soporte sólido es una perla no magnética, magnética o paramagnética.

25 5. Método según la reivindicación 1, en el que la separación se realiza mediante citometría de flujo o en un campo magnético.

6. Método de compatibilidad cruzada de un donante y un receptor, que comprende:

30 (a) aislar una célula endotelial precursora donante de acuerdo con el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y

(b) cribar una muestra del receptor para una reactividad con la célula endotelial precursora aislada,

35 en el que la falta de reactividad de la muestra del receptor con la célula precursora aislada indica compatibilidad entre el donante y el receptor.

40 7. Método *ex vivo* para el diagnóstico de un trastorno vascular o de tipo autoinmunitario en un sujeto, que comprende:

(a) aislar una célula endotelial precursora de acuerdo con el método según la reivindicación 1,

45 (b) poner en contacto la célula endotelial precursora con una muestra que contiene, o que se sospecha que contiene, un autoanticuerpo procedente del sujeto, y

(c) identificar un complejo de autoanticuerpo-célula endotelial precursora, en caso de encontrarse presente.

50 en el que la presencia del complejo indica la presencia del trastorno en el sujeto.

8. Método *ex vivo* para la determinación de la eficacia de tratamiento, o para la evaluación de un pronóstico, de un trastorno vascular o de tipo autoinmunitario en un sujeto, que comprende:

55 (a) aislar una célula endotelial precursora de acuerdo con el método según la reivindicación 1,

(b) poner en contacto la célula endotelial precursora con una muestra que contiene, o que se sospecha que contiene, un autoanticuerpo procedente del sujeto,

60 (c) medir un complejo de autoanticuerpo-célula endotelial precursora en caso de encontrarse presente, para proporcionar un perfil del sujeto, y

(d) comparar el perfil del sujeto con un perfil de referencia,

65 en el que una similitud entre el perfil del sujeto y el perfil de referencia indica que el tratamiento resulta eficaz y un pronóstico favorable para el sujeto.

ES 2 337 244 T3

9. Método según la reivindicación 7 ó 8, en el que el trastorno se selecciona de entre el grupo que consiste de vasculitis, aterosclerosis, trastornos hemorrágicos, cicatrización defectuosa de heridas y trasplante.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

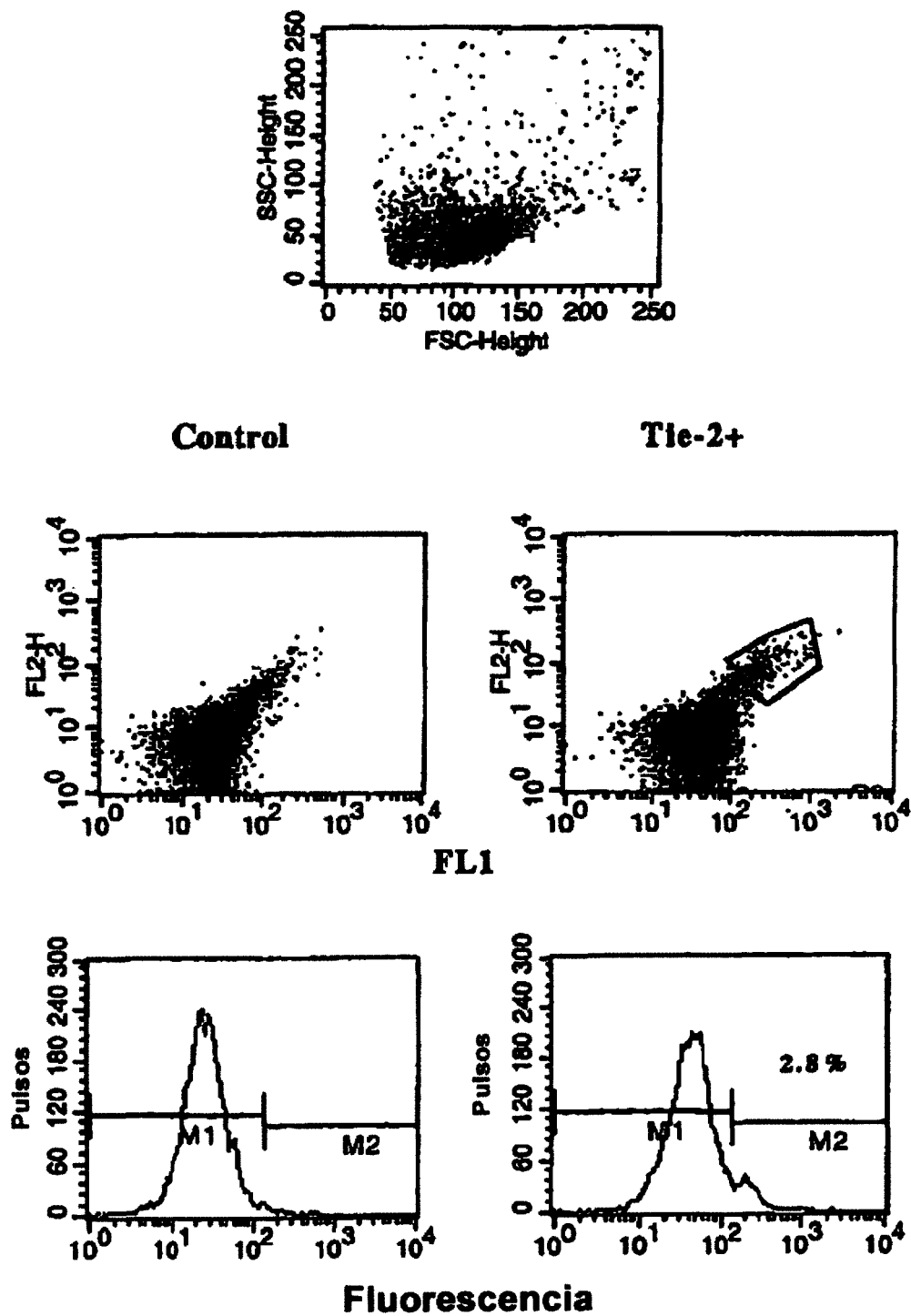


Figura 2

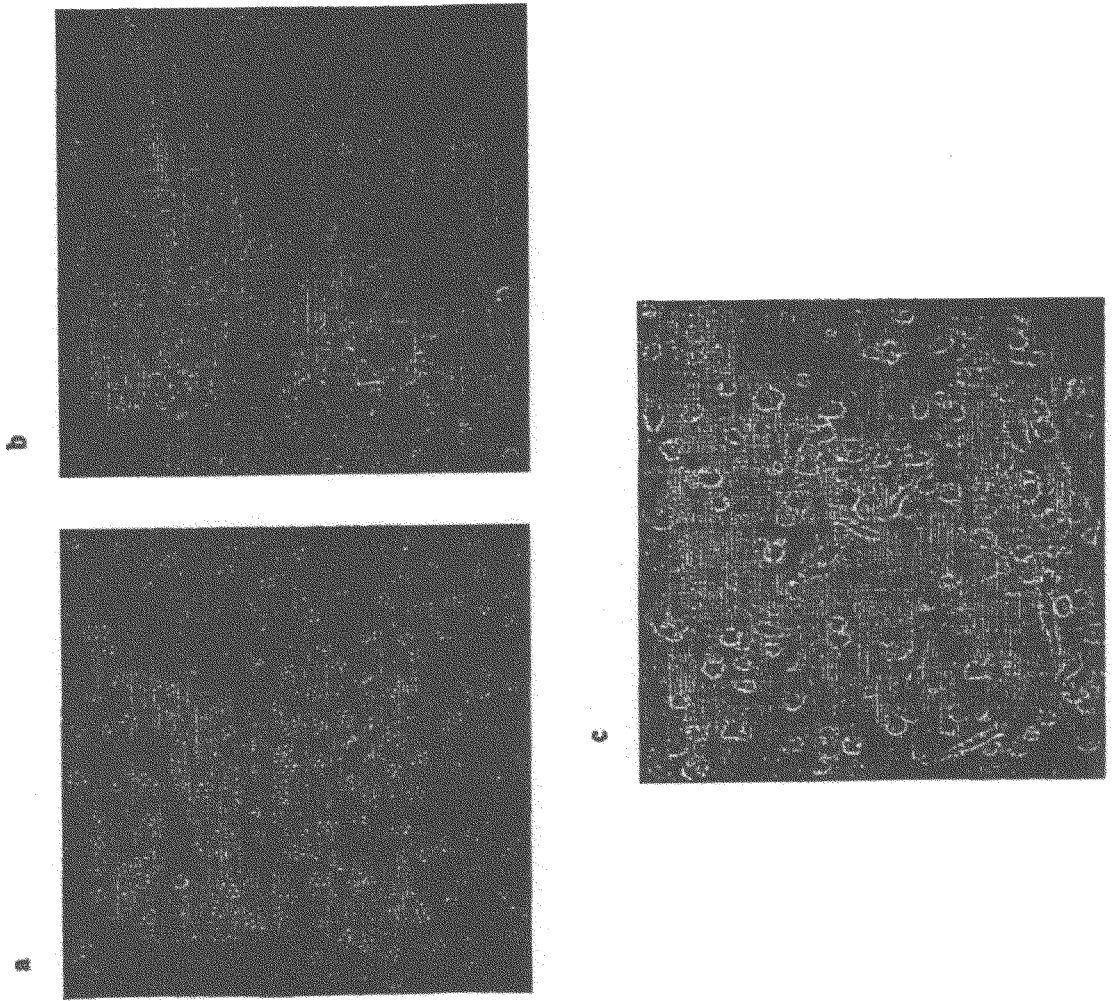


Figura 3

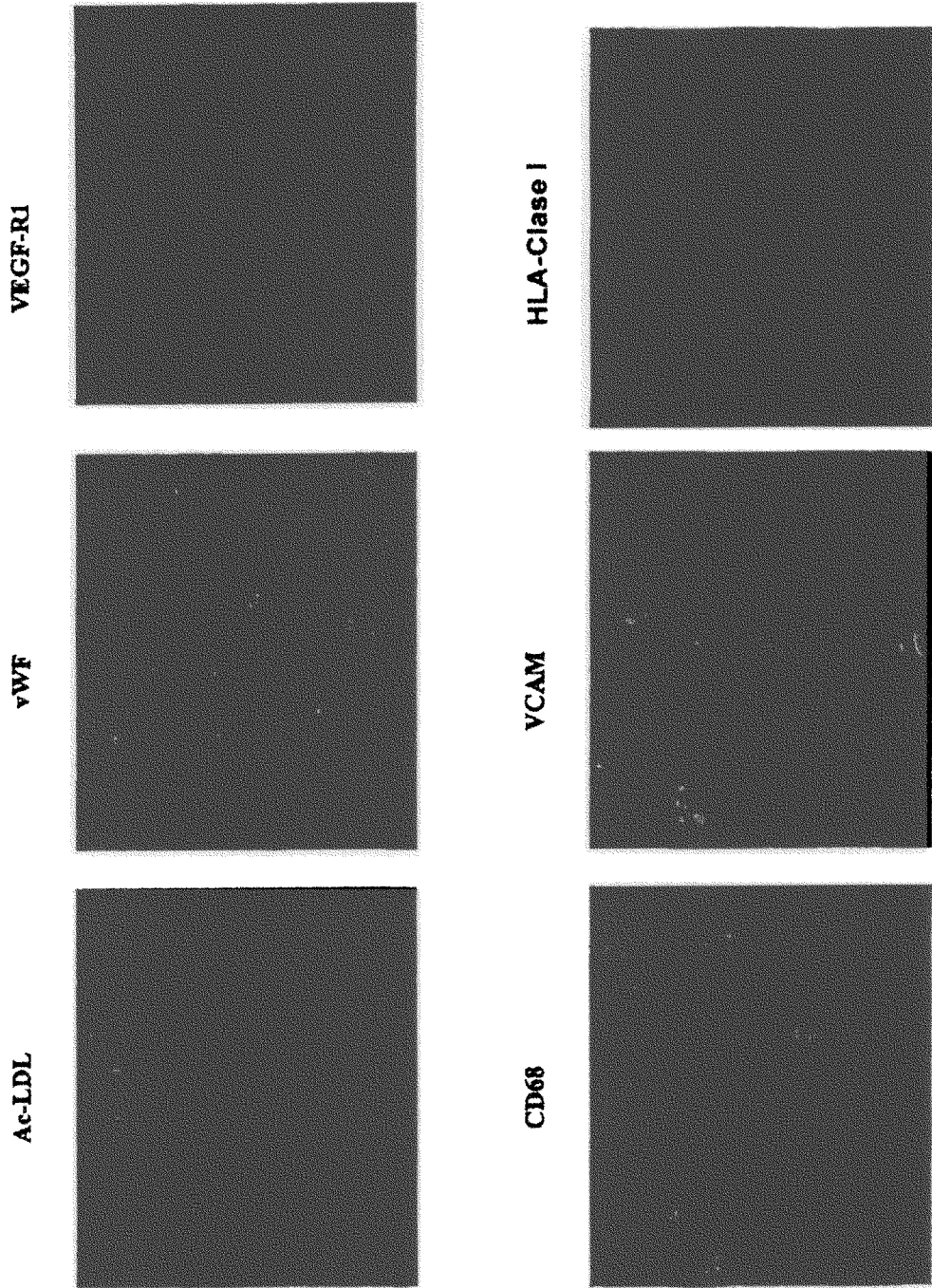


Figura 3b

**Expresión de MICA y
HLA de clase II**

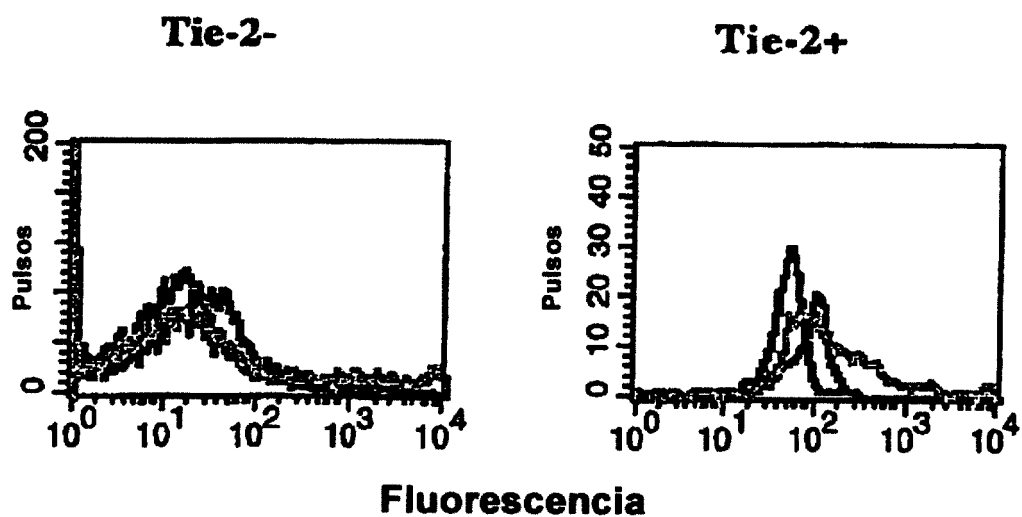
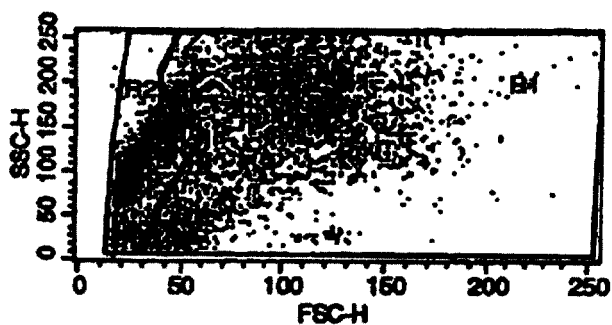


Figura 4

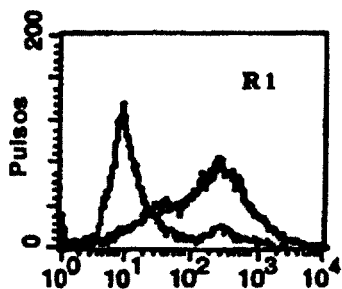
**Compatibilidad cruzada de células Tie-2+ (endoteliales)
específicas de donante**

a



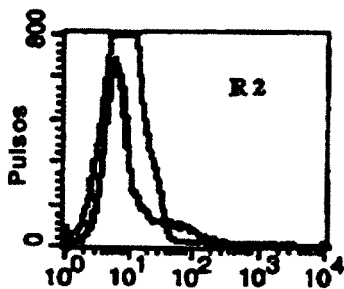
b

Perlas+células Tie-2+



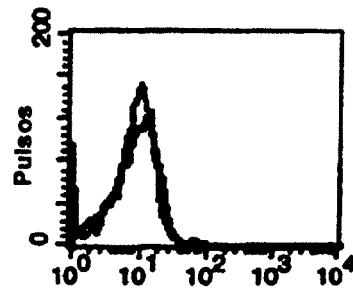
c

Perlas Tie-2 solas



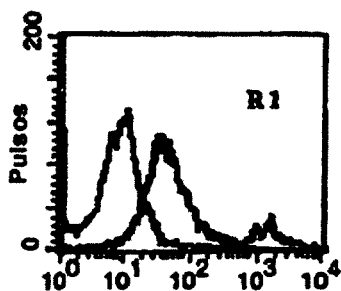
d

Células Tie-2-

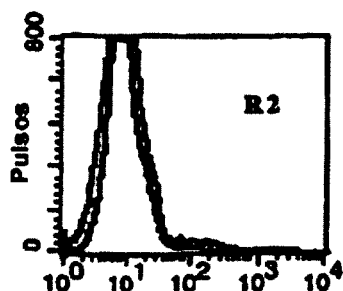


Fluorescencia

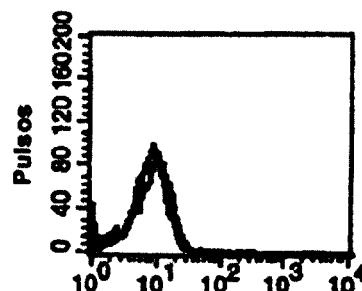
e



f



g



Fluorescencia