

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 039**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/58** (2006.01)  
**G01N 33/80** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07804873 .3**  
96 Fecha de presentación: **23.03.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2010920**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2009**

54 Título: **ANTÍGENOS DE GRUPO SANGUÍNEO DE DIFERENTES TIPOS PARA APLICACIONES  
DIAGNÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS.**

30 Prioridad:  
**23.03.2006 US 785700 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.12.2011**

73 Titular/es:  
**ABSORBER AB  
DROTTNINGGATAN 33, BOX 7710  
103 95 STOCKHOLM, SE**

72 Inventor/es:  
**HOLGERSSON, Jan;  
LIU, Jining;  
BJORNSTROM, Linda y  
GRUFMAN, Per**

74 Agente: **Sugrañes Moline, Pedro**

ES 2 371 039 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**

Antígenos de grupo sanguíneo de diferentes tipos para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere de manera general a composiciones para el tratamiento o la prevención del rechazo a injertos mediado por anticuerpos y, más particularmente, a composiciones que incluyen determinantes de grupo sanguíneo útiles para extraer los anticuerpos contra los antígenos de grupo sanguíneo.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Ya en los inicios del trasplante, se encontraba que el trasplante renal a través de las barreras ABO produce una alta incidencia de trasplantes que no llegan a ser funcionales, y por tanto el cumplimiento de las reglas tradicionales de Landsteiner usadas para la transfusión de sangre se contemplaba como un requisito previo en alotrasplante. Las isoaglutininas preformadas anti-A/B del receptor son responsables del rechazo hiperagudo de injertos con incompatibilidad ABO. Este rechazo hiperagudo es similar al observado en pacientes aloinmunizados con anticuerpos reactivos al HLA del donante. El primer intento de atravesar la barrera ABO en trasplantes se inició a principios de 1970, injertando riñones procedentes de un cadáver del grupo sanguíneo A<sub>2</sub> a receptores O.<sup>1</sup> En la década de los 80, usando donantes A<sub>1</sub> y B, Alexandre llevó a cabo la primera serie de trasplantes renales de donantes vivos (DV) con incompatibilidad ABO y obtuvo una supervivencia al injerto similar a la de los casos con compatibilidad ABO. El protocolo inmunosupresor englobaba plasmaféresis preoperatoria para extraer los anticuerpos anti-A/B, la transfusión de las plaquetas del donante, esplenectomía y terapia de inducción con globulinas anti-linfocitos/timocitos, inyección de sustancias del grupo sanguíneo A o B extraídas del estómago del cerdo y ciclosporina-azatioprina-prednisona. Desde entonces, en todo el mundo se ha informado de más de 500 casos de trasplantes renales de DV con incompatibilidad ABO, principalmente en Japón (revisado en <sup>1</sup>), y ha sido bien documentada la importancia de reducir los niveles de anticuerpo anti-A/B en el receptor.<sup>2,3</sup> La supervivencia al injerto en esta serie es buena (1 año de supervivencia al injerto en el 85% aproximadamente de los donantes A<sub>1</sub> y B) pero ligeramente inferior a la de los injertos con compatibilidad ABO debido a casos aislados de rechazo severo mediado por anticuerpos anti-A/B.<sup>4,5</sup> Datos recientes sobre trasplantes renales con incompatibilidad ABO usando un anticuerpo anti-CD20 (Rituximab) combinado con la extracción de anticuerpos han demostrado ser incluso mejores con respecto a la supervivencia al injerto.<sup>6,7</sup>

El documento US 2003/0073822 se refiere a polipéptidos de fusión, y su uso en el tratamiento del rechazo a injertos mediado por anticuerpos. Las fusiones comprenden epítopos del grupo sanguíneo expresados sobre esqueletos proteicos de tipo mucina.

En momentos de gran escasez de órganos, un mayor uso de injertos procedentes de donantes con incompatibilidad ABO permitirá la realización de un mayor número de trasplantes de riñón de DV. Además, la experiencia adquirida en este campo también será aplicable en el tratamiento previo y en la gestión después del trasplante de pacientes sensibilizados por el HLA.<sup>8</sup>

40

**RESUMEN DE LA INVENCION**

La invención se basa, en parte, en composiciones y procedimientos mejorados para la extracción de los anticuerpos contra antígenos de grupo sanguíneo a partir del plasma y un procedimiento de tipado de la sangre.

45

En un aspecto la invención proporciona una composición que comprende antígenos de grupo sanguíneo que incluyen:

50

A tipo 1 GalNAcα1,3(Fuca1,2)Galβ1,3GlcNAcβ1-R,

A tipo 2 GalNAcα1,3(Fuca1,2)Galβ1 4GlcNAcβ1-R,

55

A tipo 3 GalNAcα1,3(Fuca1,2)Galβ1,3GalNAcα1-R,

A tipo 4 GalNAcα1,3(Fuca1,2)Galβ1,3GalNAcβ1-R,

60

B tipo 1 Galα1,3(Fuca1,2)Galβ1,3GlcNAcβ1-R,

B tipo 2 Galα1,3(Fuca1,2)Galβ1,4GlcNAcβ1-R,

B tipo 3 Galα1,3(Fuca1,2)Galβ1,3GalNAcα1-R, y

65

B tipo 4 Galα1,3(Fuca1,2)Galβ1,3GalNAcβ1-R

en los que R representa un punto adecuado para su unión a un soporte sólido.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la determinación de la presencia de anticuerpos de grupo sanguíneo en una muestra procedente de un sujeto (por ejemplo, tipado de la sangre), dicho procedimiento que comprende:

a) el suministro de una colección de microperlas de diferentes subtipos, en las que cada subtipo está recubierto con un antígeno de grupo sanguíneo diferente, incluyendo:

- 10 A tipo 1 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R,
- A tipo 2 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R,
- 15 A tipo 3 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R,
- A tipo 4 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R,
- B tipo 1 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R,
- 20 B tipo 2 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R,
- B tipo 3 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R, y
- B tipo 4 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R

b) la adición de dicho suero procedente de dicho sujeto a dicha colección de microperlas;

c) la incubación de dicho suero y dichas microperlas durante un periodo de tiempo suficiente para que los anticuerpos contra el grupo sanguíneo en dicho suero se unan a dichos antígenos de grupo sanguíneo;

d) la incubación de dichas microperlas con al menos un ligando marcado capaz de unirse específicamente a dichos anticuerpos contra el grupo sanguíneo unidos a dichos antígenos de grupo sanguíneo; y

e) la detección de la presencia de un ligando marcado unido a dichos anticuerpos contra el grupo sanguíneo para determinar la presencia o ausencia de dichos anticuerpos reactivos.

El ligando es, por ejemplo, un anticuerpo o uno de sus fragmentos. El anticuerpo es un fragmento de anticuerpo monovalente tal como un fragmento Fab o Fab'. Por ejemplo, el fragmento Fab o Fab' es un fragmento de anticuerpo contra Fc, un fragmento de anticuerpo contra la cadena ligera kappa, un fragmento de anticuerpo contra la cadena ligera lambda, y un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla. El marcador es, por ejemplo, un marcador fluorescente. El ligando marcado se detecta mediante procedimientos conocidos en la materia tales como citometría de flujo o luminex.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para la extracción de anticuerpos reactivos contra los grupos sanguíneos del suero, dicho procedimiento que comprende:

a) el suministro de una colección de microperlas de diferentes subtipos, donde cada subtipo está recubierto con un antígeno de grupo sanguíneo diferente, incluyendo:

- 50 A tipo 1 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R,
- A tipo 2 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R,
- 55 A tipo 3 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R,
- A tipo 4 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R,
- B tipo 1 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R,
- 60 B tipo 2 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R,
- B tipo 3 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R, y
- B tipo 4 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R

b) la puesta en contacto de dicho suero con dicha colección de microperlas;

c) la incubación de dicho suero y dichas microperlas durante un periodo de tiempo suficiente para que los anticuerpos contra el grupo sanguíneo en dicho suero se unan a dichos antígenos de grupo sanguíneo;

5 d) la separación de dichas microperlas y dicho suero, extrayendo así dichos anticuerpos reactivos de dicho suero.

Opcionalmente, el oligosacárido ABO o las proteínas de fusión ABO están unidos, por ejemplo, covalente o no covalentemente a un soporte sólido tal como microperlas. Las microperlas son de látex, por ejemplo. Por microperlas de un subtipo diferente se quiere decir que las microperlas difieren entre sí en tamaño, color o ambos. El intervalo de diámetros se encuentra entre 2  $\mu\text{m}$  aproximadamente y 15  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

10 Preferiblemente, la microperla tiene un diámetro de 5  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Más preferiblemente, las microperlas tienen un diámetro de 5  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

15 La muestra es de, por ejemplo, sangre entera, suero o plasma.

En algunos aspectos, las composiciones se formulan como un absorbente para la extracción de anticuerpos contra el grupo sanguíneo a partir de sangre completa o plasma. La invención también proporciona una colección de microperlas de diferentes subtipos, donde cada subtipo está recubierto con un antígeno de grupo sanguíneo diferente. Por ejemplo, la colección contiene microperlas de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 25, 30, 40, 50 o más subtipos diferentes.

20 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el utilizado habitualmente por alguien con conocimientos ordinarios en la materia a la que pertenece esta invención.

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

### 30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 es una representación esquemática de los vectores usados para producir las proteínas de fusión que contienen los antígenos de grupo sanguíneo.

35 La Figura 2 es una fotografía que muestra la localización celular PSGL-1/mIgG2b que se determinó mediante inmunofluorescencia indirecta. La proteína PSGL-1/mIgG2b se detectó usando la Fc de un anticuerpo IgG de cabra dirigido contra ratón conjugado a FITC (Sigma) y diluido a 1:200 en tampón de bloqueo. Los núcleos celulares se tiñeron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

40 La Figura 3 es una fotografía de una transferencia de Western que muestra diferentes cadenas principales exteriores que llevan determinantes del grupo sanguíneo A.

45 La Figura 4 es una representación esquemática de un esquema de transfección ABH para producir péptidos de fusión ABO sobre diferentes precursores del glicano.

La Figura 5 son gráficas que muestran los resultados de la citometría de flujo en perlas de 5 tamaños e intensidades de color diferentes, que muestran claramente que es posible usar perlas de numerosas combinaciones de tamaño-color. Usando combinaciones de los tamaños y colores mostrados anteriormente sería posible preparar una mezcla de hasta 25 perlas diferentes, cada una que expresa un antígeno de grupo sanguíneo único.

50 La Figura 6 es una representación esquemática de las estructuras principales exteriores del antígeno de grupo sanguíneo.

55 La Figura 7 es una representación esquemática de antígenos del grupo sanguíneo ABH.

La Figura 8 es una representación gráfica de los resultados de la citometría de flujo que identifica anticuerpos contra el grupo sanguíneo en suero.

60 La Figura 9 es una serie de gráficas de dispersión que muestran anticuerpos IgG e IgM contra el grupo sanguíneo A en suero procedente de individuos A, B y O.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

65 La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los epítomos de grupo sanguíneo se pueden expresar específicamente a una densidad elevada y por diferentes cadenas principales de sacáridos (por ejemplo, tipo 1, tipo 2, tipo 3 o tipo 4) en forma de sacáridos libres o sobre esqueletos proteicos de tipo mucina. Se ha descubierto que el

uso de antígenos de grupo sanguíneo transportados por las diferentes cadenas principales de sacáridos es más eficiente en la extracción de los anticuerpos contra el grupo sanguíneo de la sangre cuando se usan en combinación antes del trasplante. Adicionalmente, las composiciones de la invención son diagnósticas y de pronóstico útiles para determinar la presencia de anticuerpos reactivos al grupo sanguíneo en un sujeto.

5

En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende antígenos de grupo sanguíneo que incluyen:

10 A tipo 1 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R,

A tipo 2 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R,

A tipo 3 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R,

15 A tipo 4 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R,

B tipo 1 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R,

20 B tipo 2 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R,

B tipo 3 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R, y

B tipo 4 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R

25 en los que R representa un punto adecuado para su unión a un soporte sólido.

Estos oligosacáridos se denominan en el presente documento "oligosacáridos ABO". Los antígenos de grupo sanguíneo están exentos de sacáridos.

30 Opcionalmente, los oligosacáridos ABO están unidos a un soporte sólido para permitir la separación de los antígenos de grupo sanguíneo de la sangre.

Por consiguiente, los oligosacáridos ABO son útiles en la eliminación de los anticuerpos ABO contra el grupo sanguíneo de la sangre o del plasma antes de, por ejemplo, el trasplante de un órgano incompatible con ABO, el trasplante de médula ósea o con el fin de preparar plasma de donante universal. Los oligosacáridos ABO absorben el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 100% de los anticuerpos ABO contra el grupo sanguíneo [tau] procedente de la sangre o el plasma del receptor.

40 El oligosacárido ABO es más eficiente en una base molar de carbohidratos en la extracción o unión de anticuerpos contra el grupo sanguíneo en comparación con oligosacáridos de grupo sanguíneo expresados sobre una cadena principal de sacárido sencilla. El oligosacárido ABO se une 2, 4, 10, 20, 50, 80, 100 o un mayor número de veces a anticuerpos contra el grupo sanguíneo en comparación con una cantidad equivalente de sacáridos libres expresados sobre una cadena principal de sacárido sencilla.

45 Los oligosacáridos ABO también son útiles en un procedimiento de tipado de la sangre. Los procedimientos de la invención son superiores a los procedimientos actuales de tipado de la sangre puesto que permiten la cuantificación de anticuerpos de grupo sanguíneo de diferentes clases y subclases. En particular, permiten la detección de anticuerpos específicos del tipo de cadena. Esto es clínicamente relevante puesto que el sistema inmunitario puede responder específicamente a antígenos de grupo sanguíneo sobre diferentes cadenas principales. Además los antígenos de grupo sanguíneo sobre diferentes cadenas principales se expresan de una forma específica de célula y de tejido. Así, permitiendo la detección de anticuerpos específicos de cadena permitirá mejores pruebas cruzadas donante-receptor en aloinjertos de órganos con incompatibilidad ABO, que reducirá el rechazo hiperagudo.

#### 55 *Antígenos del grupo histo-sanguíneo ABH*

El antígeno ABH se encuentra en casi todas las células del cuerpo humano, pero su papel fisiológico, si es que lo tiene, sigue siendo una cuestión sin resolver. Son de naturaleza glucídica y están formados por diferentes glicosiltransferasas, es decir, enzimas que añaden unidades monosacarídicas de manera secuencial al extremo no reductor de la cadena del oligosacárido en crecimiento. Los oligosacáridos pueden ser transportados por proteínas o lípidos,<sup>9</sup> o se pueden encontrar libres en los fluidos corporales (por ejemplo, la leche materna).<sup>9</sup>

65 Los antígenos ABH se dividen en subgrupos, dependiendo de la cadena principal interna del sacárido.<sup>9</sup> Como ejemplo, los antígenos A, B y H se expresan sobre las cadenas de tipo 1 (Gal $\beta$ 1,3GlcNAc), tipo 2 (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc), tipo 3 (Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ ) y tipo 4 (Gal $\beta$ 1, 3GalNAc $\beta$ ). Los antígenos ABH de cadena tipo 4 sólo se encuentran unidos a lípidos. Los antígenos H se producen con la adición de una fucosa en una de las diferentes cadenas principales que contienen una galactosa terminal. Los dos antígenos A y B se producen a partir de subtipos

de H con la adición de una N-acetilgalactosamina (A) o una galactosa (B) en un enlace  $\alpha$ 1,3 a la galactosa terminal. Las glicosiltransferasas responsables de la biosíntesis de los antígenos A y B requieren la presencia de  $\alpha$ 1,2-fucosa para la adición de la N-acetilgalactosamina terminal y la galactosa, respectivamente.

5 Dos  $\alpha$ 1,2-fucosiltransferasas estructuralmente distintas permiten la biosíntesis del antígeno H como fue descrito inicialmente por Oriol.<sup>10</sup> Una es codificada por el locus H (FUT-I) y la otra por el locus secretor (Se) (FUT-II). El producto génico de FUT-I es responsable de la expresión del antígeno H en eritrocitos y actúa predominantemente sobre las cadenas de tipo 2, pero también se ha demostrado que tienen actividad hacia cadenas de tipo 1. En  
10 contraste, el producto génico de FUT-II es expresado por las células acinares de las glándulas salivales así como por las células epiteliales que recubren los tractos gastrointestinal, reproductor y pulmonar, y actúa principalmente sobre cadenas de tipo 1, pero probablemente también sobre cadenas de tipo 3 y 4.

Se ha demostrado que los productos génicos responsables de la expresión del antígeno A y B tienen un origen común.<sup>11</sup> Las mutaciones que dan lugar a la sustitución de cuatro restos aminoácidos en el producto génico  
15 codificado por A en comparación con el producto génico codificado por B dan como resultado una variación en la preferencia del azúcar-nucleótido del donante de UDP-N-acetilgalactosamina a UDP-galactosa. El fenotipo denominado serológicamente O carece de la expresión de los dos productos génicos debido a una mutación por desplazamiento del marco de lectura en el alelo A original, y por tanto no expresa los determinantes A o B.<sup>11</sup> El grupo sanguíneo A se ha subdividido en grupos serológicamente distintos, siendo los subgrupos más frecuentes el A<sub>1</sub> y el A<sub>2</sub>.<sup>12</sup> Estos subtipos de A son producidos por dos  $\alpha$ 1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasas distintas, una con una preferencia por los antígenos H de tipo 3 y 4 (A<sub>1</sub>) y la otra con una preferencia por los antígenos H de tipo 1 y 2 (A<sub>2</sub>).

#### *La importancia de la multivalencia*

25 Las interacciones proteína-carbohidrato generalmente se caracterizan por una baja afinidad de unión. Aunque esto pueda parecer absurdo, proporciona la base para una rápida velocidad de encendido/apagado que es esencial en las condiciones fisiológicas puesto que permite que se produzcan interacciones rápidas altamente variables entre los receptores celulares, los anticuerpos y otras proteínas que se unen a carbohidratos y sus ligandos glicosilados. En la naturaleza se consiguen unas mayores afinidades, cuando son necesarias, mediante el uso de la multivalencia. La unión de varios receptores sobre una entidad biológica a varios ligandos carbohidrato en otra, puede dar como resultado un incremento de la afinidad de 10-10.000 veces. Ejemplos de interacciones polivalentes incluyen la unión de microbios (virus, bacterias o toxinas bacterianas) a una superficie celular, la unión célula-célula, y la unión de moléculas polivalentes, tales como anticuerpos, a una superficie celular.<sup>13</sup> La inhibición de interacciones polivalentes con inhibidores monovalentes normalmente es ineficaz incluso si la actividad de unión del inhibidor ha sido estructuralmente optimizada. Por consiguiente, se han usado una serie de moléculas diferentes (por ejemplo, poliacrilamida, péptidos, seroalbúmina bovina, dendrímeros y ciclodextrinas) como esqueletos para múltiples presentaciones de mono- y oligosacáridos en un intento por crear uniones multivalentes de los receptores correspondientes.<sup>13</sup> Una aproximación alternativa supone la asociación no covalente del ligando con los grupos  
40 cabeza de liposomas, membranas u otras superficies.<sup>13</sup> El éxito de estos glicoconjugados varía, pero en general la afinidad se potencia de 10 a 1000 veces en comparación con las interacciones monovalentes. En unos pocos casos<sup>13</sup> se han conseguido actividades nanomolares que muy habitualmente caracterizan las interacciones fisiológicas proteína-carbohidrato optimizando la presentación del ligando (es decir, la estructura del ligando, el grado de valencia, la estructura del esqueleto y la distancia intra/inter-ligando), es decir, se mimetizó con todo el detalle posible la forma de presentación del carbohidrato en la naturaleza.

#### *Mucinas recombinantes con sustitución a medida del glicano como absorbentes eficientes de anticuerpos contra carbohidratos*

50 Las proteínas de tipo mucina normalmente se encuentran en las superficies de la mucosa y se caracterizan por su abundante sustitución de O-glicano (cada dos a tres aminoácidos). Hasta el 50% de su peso molecular se debe a la sustitución de carbohidratos. Con la co-expresión de diversos ADNc de glicosiltransferasas con la Ig-mucina se pueden determinar las estructuras de sus O-glicanos de tal manera que lleve varias copias de determinantes de carbohidratos biológicamente importantes. De esta forma, se han preparado mucinas que llevan determinantes del grupo sanguíneo A y se ha demostrado que se unen a anticuerpos contra el grupo sanguíneo A con una eficacia elevada.<sup>1</sup> De hecho, se demostró que los absorbentes basados en mucina de los anticuerpos contra el grupo sanguíneo A son unas 100 veces más eficientes (calculado según el número de determinantes del grupo sanguíneo A) en la unión de anticuerpos contra A que el trisacárido del grupo sanguíneo A unido directamente mediante un espaciador a perlas de agarosa (ésta es la disposición de Glucosorb<sup>®</sup>). Esto se explica por el hecho de que varias copias del determinante A se expresan con un espaciamiento de unión al anticuerpo óptimo sobre una proteína portadora de tipo mucina. Asimismo, las mucinas recombinantes que llevan el epítipo carbohidrato, Gal<sub>1,3</sub>Gal( $\alpha$ , -Gal), han demostrado ser absorbentes muy eficientes de anticuerpos contra Gal; el obstáculo principal que impide el xenotrasplante de cerdo a humano con éxito.<sup>15-17</sup> Así, las mucinas son estructuras muy eficientes para la presentación óptima de carbohidratos bioactivos.

65

*La importancia de los subtipos antigénicos de grupo sanguíneo*

Como se ha descrito anteriormente, los determinantes del grupo sanguíneo ABH pueden ser portados por diferentes cadenas principales de sacáridos. Éstos tienen una distribución específica de célula y específica de tejido en el cuerpo humano, y la importancia de los antígenos ABH individuales como moléculas diana para los anticuerpos contra el grupo sanguíneo ABH no se conoce. De forma similar, no se conoce si el repertorio de anticuerpos contra el grupo sanguíneo ABH es heterogéneo, es decir, si se pueden distinguir subpoblaciones de estos anticuerpos entre los diferentes subtipos de antígenos ABH y si realmente es necesaria para la unión otra parte de la cadena del carbohidrato aparte del trisacárido terminal. Algunos datos sugieren que es suficiente sólo con usar el trisacárido A o B para la absorción de todos los anticuerpos específicos para los antígenos de los grupos sanguíneos A o B, respectivamente, lo que indica que también sería cierto para la detección de estos anticuerpos.<sup>19-20</sup> Sin embargo los datos de la presente invención muestran que es posible obtener una absorción y detección de anticuerpos más eficiente usando diferentes subtipos (es decir, transportados por diferentes cadenas principales de sacáridos) de los antígenos del grupo sanguíneo ABH.

*Oligosacáridos con cadenas principales de sacáridos a medida como absorbentes eficientes de anticuerpos contra carbohidratos*

Siguiendo con la descripción anterior, la invención proporciona una mezcla de oligosacáridos que portan los determinantes ABH sobre diferentes cadenas principales de sacáridos (para obtener una heterogenicidad estructural) que absorberán un repertorio más amplio de anticuerpos contra A/B. Las mezclas correspondientes de proteínas de fusión de tipo mucina también absorberían un espectro más amplio de anticuerpos. Usando diferentes combinaciones de genes de la glicosiltransferasa, la proteína de fusión mucina-inmunoglobulina se puede manipular genéticamente para que lleve varias copias de glicanos O-unidos con cadenas principales de sacáridos internas y externas definidas. Éstas se pueden elongar adicionalmente con los determinantes ABH. Así, se puede usar tecnología recombinante para preparar mucinas del grupo sanguíneo A o B estructuralmente variadas, que se pueden usar para adsorber un amplio repertorio de anticuerpos contra A o B.

**OLIGOSACÁRIDOS ANTIGÉNICOS DE GRUPO SANGUÍNEO**

La invención proporciona oligosacáridos antigénicos de grupo sanguíneo. Los antígenos de grupo sanguíneo incluyen (A, B, y O (H)). Los antígenos de grupo sanguíneo son específicos para todos los subtipos de grupos sanguíneos. Por subtipos de grupos sanguíneos se quiere decir que los antígenos de grupo sanguíneo se expresan sobre diferentes tipos de cadenas principales de sacárido. Los tipos de cadenas principales de sacáridos incluyen los precursores del glicano de tipo 1, tipo 2, tipo 3 y tipo 4.

Ejemplos de oligosacáridos antigénicos de grupo sanguíneo incluyen los siguientes:

Antígenos del grupo sanguíneo A en los tipos 1-4

- 40 A tipo 1 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R  
 A tipo 2 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R  
 45 A tipo 3 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc1-R  
 A tipo 4 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc31-R

Antígenos del grupo sanguíneo B en los tipos 1-4

- 50 B tipo 1 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R  
 B tipo 2 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R  
 55 B tipo 3 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc1-R  
 B tipo 4 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R

60 en los que R representa el punto de unión cuando el oligosacárido está unido a un soporte sólido, o no representa nada cuando el oligosacárido es un sacárido libre.

**COMPOSICIÓN Y KITS**

La invención proporciona composiciones que comprenden antígenos de grupo sanguíneo incluyendo:

- 65 A tipo 1 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R,

- A tipo 2 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R,  
 5 A tipo 3 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R,  
 A tipo 4 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R,  
 B tipo 1 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R,  
 10 B tipo 2 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R,  
 B tipo 3 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R, y  
 B tipo 4 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R  
 15

Opcionalmente, los oligosacáridos ABO están unidos a un soporte sólido. La unión es covalente. Alternativamente, la unión es no covalente.

20 El soporte sólido puede ser, por ejemplo, una perla, una resina, una membrana o un disco, o cualquier material de soporte sólido adecuado para los procedimientos de la invención. Preferiblemente, el soporte sólido es una perla, por ejemplo, una microperla. El tamaño de la perla no es crítico. Normalmente, la perla tiene un diámetro de al menos 1 a 50  $\mu$ m, siendo preferido un tamaño de partícula de 1 a 10  $\mu$ m. Lo más preferiblemente, las perlas tienen un diámetro de 4-10  $\mu$ m aproximadamente. Por ejemplo, un diámetro de 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 ó 50  $\mu$ m.

25 La perla puede ser de compuestos metálicos, sílice, látex, material polimérico, o núcleos de sílice, látex o polímero recubiertos con un metal o un compuesto metálico.

30 El soporte sólido puede llevar grupos funcionales como hidroxilo, carboxilo, aldehído o grupos amino. El soporte puede estar cargado positivamente, cargado negativamente o ser hidrófobo. Los soportes recubiertos funcionalizados para su uso en la presente invención se pueden preparar con la modificación del soporte. Por ejemplo, soportes no recubiertos se pueden tratar con un polímero que lleva uno o varios grupos funcionales, tales como poliuretano junto con un poliglicol para suministrar grupos hidroxilo o un derivado de celulosa para suministrar grupos hidroxilo, un polímero o copolímero de ácido acrílico o ácido metacrílico para suministrar grupos carboxilo o un polímero aminometilado para suministrar grupos amino. La patente de EE.UU. N° 4.654.267 describe la  
 35 introducción de muchos recubrimientos superficiales.

Preferiblemente cada oligosacárido ABO diferente se encuentra sobre una microperla de un subtipo diferente. Por subtipo se quiere decir que cada microperla se puede distinguir de manera detectable, tal como por ser de diferentes tamaños o tener marcadores distinguibles. Dicho uso de microperlas de tamaños diferentes o microperlas marcadas,  
 40 como con fluoróforos, permite la identificación y/o separación de diferentes perlas mediante, por ejemplo, citometría de flujo.

Los kits para la separación o identificación de anticuerpos reactivos contra grupos sanguíneos a partir de una muestra según los procedimientos de la invención pueden contener una colección de microperlas de subtipos  
 45 diferentes, cada subtipo que está recubierto con un oligosacárido ABO o una proteína de fusión ABO diferentes. Opcionalmente, el kit contiene al menos un ligando marcado capaz de unirse específicamente a un anticuerpo contra el antígeno de un grupo sanguíneo. Por ejemplo, el ligando es un anticuerpo o uno de sus fragmentos. El anticuerpo o uno de sus fragmentos es un anticuerpo monoclonal. Alternativamente, el anticuerpo o uno de sus fragmentos es un anticuerpo policlonal. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante. El anticuerpo es un  
 50 fragmento de anticuerpo tal como los fragmentos F<sub>ab</sub>, F<sub>ab'</sub>- y F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub>. Por "se una específicamente" o "reacciona inmunológicamente con" se quiere decir que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona (es decir, no se une) a otros polipéptidos o se une con una afinidad muy inferior (K<sub>d</sub> > 10<sup>-6</sup>) con otros polipéptidos.

55 El anticuerpo es monovalente.

El marcador es cualquier sustancia usada para facilitar la identificación y/o cuantificación de una diana. Los marcadores se observan o se miden directamente o se observan o se miden indirectamente. Los marcadores incluyen, pero no están limitados a radiomarcadores que se pueden medir con dispositivos para la determinación de  
 60 la radiación; pigmentos, colorantes u otros cromógenos que se pueden observar visualmente o se pueden medir con un espectrofotómetro; marcadores de espín que se pueden medir con un analizador de marcadores de espín; y restos fluorescentes, en los que la señal de salida se genera con la excitación de un aducto molecular adecuado y que se puede visualizar por excitación con luz que es absorbida por el colorante o se puede medir con fluorómetros o sistemas de obtención de imágenes habituales, por ejemplo. El marcador puede ser una sustancia luminiscente como fósforo o un fluorógeno; una sustancia bioluminiscente; una sustancia quimioluminiscente, donde la señal de salida se genera por modificación química del compuesto señal; una sustancia que contiene un metal; o una enzima,  
 65

donde se produce la generación de una señal secundaria que depende de la enzima, tal como la formación de un producto coloreado a partir de un sustrato incoloro. El marcador también puede adoptar la forma de un compuesto químico o bioquímico, o una partícula inerte, incluyendo pero no limitado a oro coloidal, microesferas, puntos cuánticos, o cristales inorgánicos tales como nanocristales o fósforos (véase, por ejemplo, Beverloo, y col., Anal. Biochem. 203, 326-34 (1992)). El término marcador también se puede referir a una "marca" o hapteno que se puede unir selectivamente a una molécula marcada de manera que la molécula marcada, cuando se añade posteriormente, se usa para generar una señal detectable. Por ejemplo, se puede usar biotina, iminobiotina o destiobiotina como marca y a continuación se usa un conjugado de avidina o estreptavidina con peroxidasa de rábano (HRP) para unir a la marca, y se usa un sustrato cromogénico (por ejemplo, tetrametilbencidina) o un sustrato fluorogénico como Amplex Red o Amplex Gold (Molecular Probes, Inc.) para detectar la presencia de HRP. De manera similar, la marca puede ser un hapteno o antígeno (por ejemplo, digoxigenina), y para unir a la marca se puede usar un anticuerpo marcado enzimática, fluorescente, o radiactivamente. Los expertos en la materia conocen numerosos marcadores y éstos incluyen, pero no están limitados a, partículas, colorantes fluorescentes, haptenos, enzimas y sus sustratos cromogénicos, fluorogénicos, y quimioluminiscentes, y otros marcadores que se describen en Molecular Probes Handbook Of Fluorescent Probes And Research Chemicals de Richard P. Haugland, 6th Ed., (1996), y las posteriores actualizaciones de la 7ª edición y 8ª expedidas en CD-ROM en noviembre de 1999 y mayo de 2001, respectivamente, y en otras fuentes publicadas.

Un fluoróforo es cualquier resto químico que presente una absorción máxima por encima de 280 nm, y que, cuando está unido covalentemente a un reactivo marcador, retenga sus propiedades espectrales. Los fluoróforos incluyen, sin limitación; un pireno (incluyendo cualquiera de los compuestos derivados correspondientes descritos en la patente de EE.UU. N° 5.132.432), un antraceno, un naftaleno, una acridina, un estilbeno, un indol o bencindol, un oxazol o benzoxazol, un tiazol o benzotiazol, un 4-amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD), una cianina (incluyendo cualquiera de los compuestos correspondientes de los N° de serie de EE.UU. 09/968.401 y 09/969.853), una carbocianina (incluyendo cualquiera de los compuestos correspondientes de los N° de serie de EE.UU. 09/557.275; 09/969.853 y 09/968.401; patentes de EE.UU. N° 4.981.977; 5.268.486; 5.569.587; 5.569.766; 5.486.616; 5.627.027; 5.808.044; 5.877.310; 6.002.003; 6.004.536; 6.008.373; 6.043.025; 6.127.134; 6.130.094; 6.133.445; y las publicaciones WO 02/26891, WO 97/40104, WO 99/51702, WO 01/21624; EP 1 065 250 A1), un carbosilirilo, una porfirina, un salicilato, un antranilato, un azuleno, un perileno, una piridina, una quinolina, un borapoliiazindaceno (incluyendo cualquiera de los compuestos derivados correspondientes descritos en las patentes de EE.UU. N° 4.774.339; 5.187.288; 5.248.782; 5.274.113; y 5.433.896), un xanteno (incluyendo cualquiera de los compuestos derivados correspondientes descritos en la patente de EE.UU. N° 6.162.931; 6.130.101; 6.229.055; 6.339.392; 5.451.343 y en N° de serie de EE.UU. 09/922.333), una oxazina (incluyendo cualquiera de los compuestos derivados correspondientes descritos en la patente de EE.UU. N° 4.714.763) o una benzoxazina, una carbazina (incluyendo cualquiera de los compuestos derivados correspondientes descritos en la patente de EE.UU. N° 4.810.636), una fenalenona, una coumarina (incluyendo cualquiera de los compuestos derivados correspondientes descritos en la patente de EE.UU. N° 5.696.157; 5.459.276; 5.501.980 y 5.830.912), un benzofurano (incluyendo cualquiera de los compuestos derivados correspondientes descritos en las patentes de EE.UU. N° 4.603.209 y 4.849.362) y benzofenalenona (incluyendo cualquiera de los compuestos derivados correspondientes descritos en la patente de EE.UU. N° 4.812.409) y sus derivados. Como se usa en el presente documento, las oxazinas incluyen resorufinas (incluyendo cualquiera de los compuestos derivados correspondientes descritos en la patente de EE.UU. N° 5.242.805), amino oxacinonas, diamino oxacinonas, y sus análogos benzosustituidos.

Opcionalmente, los kits pueden contener un control positivo o negativo o ambos, instrucciones para el uso del kit (por ejemplo, instrucciones escritas, en cinta, en VCR, en CD-ROM, etc.), y medios para la recogida de muestras. Los medios para la recogida de muestras son muy conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, un medio para la recogida de muestras es un tubo Vacutainer CPT.

Los reactivos están empaquetados en contenedores separados, por ejemplo, el oligosacárido ABO (ya sea unido a una matriz sólida o empaquetado por separado con reactivos para su unión a la matriz), un reactivo control (positivo y/o negativo) y/o un ligando marcado.

## **PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO O LA PREVENCIÓN DEL RECHAZO AL INJERTO MEDIADO POR ANTICUERPOS**

También se describen procedimientos para el tratamiento o la prevención del rechazo al injerto mediado por anticuerpos (AMR), por ejemplo, rechazo al trasplante de órganos. Dichos trasplantes incluyen, pero no están limitados a, trasplante de riñón, hígado, piel, páncreas, córnea, o corazón. Está previsto que el AMR incluya cualquier rechazo al injerto mediado por anticuerpos por parte del receptor. El procedimiento incluye la puesta en contacto de una muestra biológica procedente de un sujeto con el oligosacárido ABO de la invención o con un péptido de fusión ABO. La muestra biológica es, por ejemplo, sangre, es decir, sangre completa o plasma. Se sabe que la muestra contiene o se sospecha que contiene un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo contra el grupo sanguíneo. En algunos aspectos, la muestra biológica se extrae del sujeto antes de la puesta en contacto de la muestra con el oligosacárido ABO o con el polipéptido de fusión ABO. La muestra biológica se pone en contacto con el oligosacárido ABO de la invención o el péptido de fusión ABO en condiciones que permitan la formación de un

oligosacárido ABO de la invención o un complejo péptido de fusión ABO-anticuerpo contra el grupo sanguíneo. El oligosacárido ABO de la invención o el complejo del péptido de fusión, si está presente, se separa de la muestra biológica para eliminar los anticuerpos contra el grupo sanguíneo y la muestra biológica se perfunde de nuevo en el sujeto.

5

El AMR también se puede tratar o prevenir administrando a un sujeto un polipéptido de fusión ABO.

10

El sujeto puede ser, por ejemplo, cualquier mamífero, por ejemplo, un ser humano, un primate, ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo, o cerdo. El tratamiento se administra antes de que el sujeto reciba un trasplante incompatible con ABO. Alternativamente, el tratamiento se administra después de que un sujeto reciba un trasplante incompatible con ABO.

15

La muestra biológica se pone en contacto con el oligosacárido ABO de la invención o la proteína de fusión ABO mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, plasmaféresis o inmunoadsorción extracorpórea.

20

Esencialmente, cualquier trastorno que esté etiológicamente ligado a una reacción mediada por anticuerpos se considera susceptible de prevención o tratamiento. El AMR se trata o se previene cuando la tasa de supervivencia del trasplante de órgano es superior a la de un trasplante de un órgano no tratado por el procedimiento de la invención. Por tasa de supervivencia del trasplante se quiere decir el tiempo antes de que el trasplante sea rechazado por el receptor. Por ejemplo, el AMR se trata o se previene cuando el trasplante sobrevive al menos 1, 2, 4 u 8 semanas después del trasplante. Preferiblemente, el trasplante sobrevive 3, 6, ó 13 meses. Más preferiblemente, el trasplante sobrevive 2, 3, 5 o más años.

25

#### **PROCEDIMIENTOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL GRUPO SANGUÍNEO PROCEDENTES DE UNA MUESTRA**

30

La invención proporciona procedimientos de extracción o eliminación de anticuerpos contra el grupo sanguíneo procedentes de una muestra, dicho procedimiento que comprende un procedimiento de extracción de los anticuerpos reactivos contra el grupo sanguíneo en suero, dicho procedimiento que comprende:

a) el suministro de una colección de microperlas de subtipos diferentes, donde cada subtipo está recubierto con un antígeno de grupo sanguíneo diferente, que incluye:

35

A tipo 1 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R,

A tipo 2 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R,

40

A tipo 3 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R,

A tipo 4 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R,

B tipo 1 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R,

45

B tipo 2 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R,

B tipo 3 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R, y

50

B tipo 4 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R

b) la puesta en contacto de dicho suero con dicha colección de microperlas;

c) la incubación de dicho suero y dichas microperlas durante un periodo de tiempo suficiente para que los anticuerpos contra el grupo sanguíneo en dicho suero se unan a dichos antígenos de grupo sanguíneo;

55

d) la separación de dichas microperlas de dicho suero

extrayendo así dichos anticuerpos reactivos de dicho suero.

60

La muestra es un fluido biológico tal como sangre o plasma. Alternativamente, la muestra es un tejido biológico, tal como tejido cardíaco, tejido hepático, piel, o tejido renal.

Este procedimiento es útil para producir un plasma donante universal.

## PROCEDIMIENTOS PARA EL TIPADO DE LA SANGRE

En la invención, también se incluyen procedimientos para el tipado de la sangre de un sujeto. El tipado de la sangre de un sujeto se consigue poniendo en contacto una muestra de, por ejemplo, plasma o sangre completa procedente de un sujeto con una colección de microperlas de diferentes subtipos que portan los oligosacáridos de la invención. Cada subtipo contiene un antígeno de grupo sanguíneo diferente. Los antígenos de grupo sanguíneo se expresan sobre diferentes tipos de cadenas principales de sacáridos. Las microperlas y la muestra se ponen en contacto, por ejemplo se incuban, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los anticuerpos contra el grupo sanguíneo presentes en la muestra se unan, por ejemplo formando un complejo antígeno de grupo sanguíneo-anticuerpo, a los antígenos de grupo sanguíneo sobre las microperlas.

Después de la formación del complejo, la muestra se lava opcionalmente una o más veces para retirar los componentes del plasma no unidos. Alternativamente los componentes del plasma no unidos se separan de las microperlas, llevando a cabo una etapa de separación en la que las microperlas se extraen de la muestra. La separación se lleva a cabo mediante procedimientos conocidos en la materia tales como centrifugación. Las microperlas posteriormente se ponen en contacto con un reactivo marcador que se une específicamente a los anticuerpos contra el grupo sanguíneo que se une a la microperla. Opcionalmente las microperlas se lavan una o más veces para retirar el reactivo marcador no unido. La presencia o ausencia de los anticuerpos contra el grupo sanguíneo en la muestra se determina a continuación detectando el reactivo marcador. La detección se realiza mediante procedimientos conocidos en la materia tales como citometría de flujo o luminex.

La invención también prevé la detección de múltiples anticuerpos contra el grupo sanguíneo en una muestra. Por múltiples anticuerpos de grupo sanguíneo se quiere decir no sólo anticuerpos específicos para cada uno de los grupos sanguíneos (es decir, ABH), sino anticuerpos específicos para antígenos de grupo sanguíneo de diferentes tipos de cadenas principales de oligosacáridos. Las múltiples dianas se identifican poniendo en contacto la muestra biológica con reactivos de detección adicionales, seguido de reactivo marcador específico adicional para detectar reactivos adicionales usando el procedimiento descrito anteriormente. Por ejemplo, se preparan subgrupos de microperlas con antígenos de grupo sanguíneo distintos, por ejemplo, antígenos de grupo sanguíneo que se distinguen por el tipo de cadena principal del oligosacárido. A continuación se añaden los subgrupos de microperlas a la muestra biológica en una relación controlada. En procedimientos alternativos, se preparan subgrupos de reactivos marcadores con distintos marcadores, por ejemplo, fluoróforos que se distinguen por su espectro de emisión, por ejemplo, uno que emite en el espectro verde y otro que emite en el espectro rojo. A continuación se añaden los subgrupos de reactivos marcadores a la muestra biológica que contienen los complejos reactivo de detección-diana en una relación controlada, por ejemplo, dos partes de un reactivo marcador (por ejemplo, emisión en el verde) y una parte del otro reactivo marcador (por ejemplo, emisión en el rojo) por anticuerpo de unión a la diana. De esta forma, los complejos inmuno-marcados se pueden usar para detectar una diana. Si se añade otro complejo inmuno-marcado a la muestra, la diana original se podría distinguir de la diana detectada posteriormente.

La muestra se define para que incluya cualquier material que pueda contener un antígeno de grupo sanguíneo. Normalmente la muestra es sangre completa, suero o plasma.

Los procedimientos de la invención proporcionan ventajas significativas sobre tecnologías existentes para el tipado de la sangre. Específicamente, permiten la detección de subtipos de antígenos de grupo sanguíneo. Además, los procedimientos permiten la calificación de los diferentes subtipos de antígenos de grupo sanguíneo en una muestra a determinar.

El reactivo de detección es un compuesto capaz de unirse específicamente a los anticuerpos de grupo sanguíneo unidos a la microperla. El reactivo de detección se selecciona conforme a la diana deseada. El reactivo de detección es, por ejemplo, un polipéptido tal como un anticuerpo específico de diana o uno de sus fragmentos. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes de moléculas de inmunoglobulina (Ig) inmunológicamente activas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se unen específicamente a (reaccionan inmunológicamente con) un antígeno. Dichos anticuerpos incluyen, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, fragmentos de  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}'$  y  $F_{(ab)2}$ , y una librería de expresión  $F_{ab}$ . Por "se une específicamente" o "reacciona inmunológicamente con" se quiere decir que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona (es decir, no se une) con otros polipéptidos o se une con una afinidad mucho menor ( $K_d > 10^{-6}$ ).

Los anticuerpos monoclonales son particularmente ventajosos en la puesta en práctica de los procedimientos de la presente invención. En general, los anticuerpos monoclonales son más sensibles y específicos que los anticuerpos policlonales. Además, a diferencia de los anticuerpos policlonales, que dependen de la longevidad del animal que produce el anticuerpo, el suministro de anticuerpos monoclonales es indefinido. No obstante, los anticuerpos policlonales son útiles cuando es necesario usar anticuerpos con múltiples isotipos, puesto que en general la mayoría de anticuerpos monoclonales son de la subclase IgG1.

Como se usa en el presente documento, los términos "unión inmunológica", y "propiedades de la unión inmunológica" se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se producen entre una molécula de

inmunoglobulina y un antígeno para el que es específica la inmunoglobulina. La fuerza, o afinidad de las interacciones de unión inmunológica se pueden expresar en términos de constante de disociación ( $K_d$ ) de la interacción, en la que una  $K_d$  más pequeña representa una mayor afinidad. Las propiedades de la unión inmunológica de polipéptidos seleccionados se cuantifican usando procedimientos muy conocidos en la materia. Uno de dichos procedimientos supone la medición de las velocidades de formación y disociación del complejo antígeno/sitio de unión al antígeno, donde dichas velocidades dependen de las concentraciones de los homólogos del complejo, la afinidad de la interacción, y parámetros geométricos que influyen igualmente en la velocidad en ambas direcciones. Así, tanto la "constante de la velocidad de activación" ( $K_{on}$ ) como la "constante de la velocidad de desactivación" ( $K_{off}$ ) se pueden determinar calculando las concentraciones y las velocidades de asociación y disociación reales. (Véase Nature 361:186-87 (1993)). La relación  $K_{off}/K_{on}$  permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación  $K_d$ . (Véase, en general, Davies y col. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473).

La invención se ilustrará en profundidad en los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplo 1: Construcción de vectores de expresión

El vector de expresión que lleva el ADNc del ligando 1 de la glicoproteína P-selectina/IgG<sub>2b</sub> de ratón (PSGL-1/mIgG<sub>2b</sub>) se modificó para que contuviese un sitio de escisión de enteroquinasa (EK). Este sitio se puede usar para la liberación en dirección 3' de la parte IgG<sub>2b</sub> de ratón.

El gen del grupo sanguíneo A humano se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADNc obtenido de ARN total aislado de la línea celular MKN-45, y el gen del grupo sanguíneo B se amplificó por PCR a partir de ADNc obtenido de ARN total aislado de la línea celular HuTu80.

Los vectores de expresión usados para generar transfectantes estables son bidireccionales, véanse las figuras esquemáticas. El vector de expresión PSGL-1/mIgG<sub>2b</sub> tiene el promotor EF1 $\alpha$  en dirección aguas arriba de un polienlazador, un sitio donador y aceptador de procesamiento alternativo, y la señal de poly(A) bidireccional adicional de SV40. En la dirección opuesta a esta unidad de transcripción, usando las señales de poly(A) en la dirección contraria, se encuentra una segunda unidad de transcripción que consta del promotor TK de HSV seguido por la secuencia codificante de la puromicinacetiltransferasa (PAC). De forma similar, el vector de expresión  $\beta$ 1,6GlcNAcT (enzima de 2 núcleos) contiene el promotor EF1 $\alpha$  y la secuencia codificante para el gen de resistencia a neomicina (Neo). El vector de expresión FUT2 (gen Se) contiene el mismo esqueleto del vector, pero con el promotor del CMV y el gen de resistencia a neomicina. Los vectores de expresión GalNAcT (gen A) y GalT (gen B) contienen el promotor del CMV y el gen de resistencia a blasticidina (Bsd), los vectores de expresión FUT1 (gen H) y  $\beta$ 1,3GlcNAcT6 (enzima de 3 núcleos) contienen el promotor del CMV y el gen de resistencia a zeocina, y el vector de expresión GalT5 contiene el promotor del CMV y el gen de la guanosinafosforribosiltransferasa (GPT).

Las secuencias de ADN de los vectores de expresión se verificaron por secuenciación automatizada.

### Ejemplo 2: Determinación de la expresión de PSGL-1/MIGG2B usando transferencia de western e inmunofluorescencia indirecta

La expresión de PSGL-1/mIgG<sub>2b</sub> en los sobrenadantes de un cultivo celular se determinó usando SDS-PAGE y transferencia de Western. Las muestras se corrieron en geles con un gradiente del 4-12% (Invitrogen) en tampón MES (Invitrogen), y las proteínas separadas se transfirieron electroforéticamente sobre membranas de nitrocelulosa (Invitrogen). Después de bloquear durante 1 hora en seroalbúmina bovina al 3% (BSA) en tampón fosfato salino (PBS) con Tween 20 al 0,2%, las membranas se sometieron a ensayo con sondas durante 1 hora a temperatura ambiente con la Fc de un anticuerpo IgG de cabra contra ratón conjugado a peroxidasa (Sigma) diluido a 1:4000 en tampón de bloqueo. Las membranas se lavaron tres veces con PBS que contiene Tween 20 al 0,2%, y los anticuerpos unidos se visualizaron por quimioluminiscencia usando el kit ECL (Amerham Biosciences), según las instrucciones del fabricante.

La localización celular del PSGL-1/mIgG<sub>2b</sub> se determinó por inmunofluorescencia indirecta. Células CHO-K1 cultivadas sobre portaobjetos en placas de seis pocillos se transfectaron transitoriamente con el vector de expresión PSGL-1/mIgG<sub>2b</sub> usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección, las células se lavaron con PBS y se fijaron en acetona/MeOH al 30%. Después de bloquear durante 30 minutos en BSA al 1% en PBS, se detectó la proteína PSGL-1/mIgG<sub>2b</sub> usando la Fc de un anticuerpo IgG de cabra contra ratón conjugado a FICT (Sigma) diluido a 1:200 en tampón de bloqueo. Los núcleos celulares se tiñeron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los portaobjetos se montaron sobre platinas con el Medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories). Las platinas se examinaron con un microscopio DMRXA (Leica Corp.), y se tomaron imágenes digitales con una cámara Hamamatsu C4880-40 CCD (Hamamatsu Photonics Norden AB), y el paquete de *software* Openlab (Improvision), y el *software* Adobe Photoshop (véase la Figura).

**Ejemplo 3: Adaptación de células CHO-K1 a medio exento de suero**

La línea celular CHO-K1 (ATCC CCL-61) se adaptó a medio exento de suero, Ex-cell 302 (JHR Bioscience, Inc), según las instrucciones del fabricante.

**5 Ejemplo 4: Transfección de ADN y selección clonal**

Se sembraron células CHO-K1 adaptadas a medio exento de suero en 2 matraces de 75 cm<sup>2</sup> y se transfectaron con el vector de expresión PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> usando Lipofectamine 200 CD (Invitrogen), una formulación exenta de componentes de origen animal, según las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después la transfección, las células se incubaron en medio de selección que contiene puromicina (6 µg/ml). El medio de selección se cambió cada tres días. Después de dos semanas aproximadamente, las células muertas se retiraron usando Dead Cell Removal MicroBeads (Miltenyi Biotech), según las instrucciones del fabricante. Las células vivas se clonaron individualmente en placas de 96 pocillos, y se expandieron en medio de selección durante dos semanas aproximadamente. Se recogió el sobrenadante de los cultivos celulares y se valoró la concentración de hPSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> mediante ensayo inmunoenzimático de adsorción (ELISA), véase protocolo a continuación, usando la Fc de un anticuerpo IgG de cabra contra ratón (Sigma). Los clones de células con la expresión de hPSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> más alta se seleccionaron para su expansión.

**20 Ejemplo 5: Cuantificación de la concentración de PSGL-1/MIGG<sub>2n</sub> en sobrenadantes usando ELISA**

Se sembraron células en matraces de 25 cm<sup>2</sup> (~1x10<sup>6</sup> células/ml). El sobrenadante de los cultivos celulares se recogió después de 4 días. La concentración del PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> producido por los clones de células se valoró mediante ensayo inmunoenzimático de adsorción (ELISA). Placas de ELISA de 96 pocillos (Costar 3590, Corning) se recubrieron durante 2 horas con la Fc de un anticuerpo IgG de cabra contra ratón purificado por afinidad (Sigma) a una concentración de 10 µg/ml. Las placas se bloquearon con BSA al 1% en PBS durante 2 horas. El sobrenadante que contiene el PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> se diluyó de manera seriada en tampón de bloqueo y se incubó durante 2 horas. Después del lavado, las placas se incubaron durante 2 horas con la Fc de un anticuerpo IgG de cabra contra ratón conjugado a peroxidasa (Sigma) y diluido a 1:4000 en tampón de bloqueo. El anticuerpo conjugado a peroxidasa unido se visualizó con diclorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma). La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M y las placas se leyeron a 450 nm en un lector de placas automatizado (Bio-Tek Instruments). La concentración de PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> se estimó usando como patrón una dilución seriada de fragmentos de la Fc de un anticuerpo IgG de cabra contra ratón (Sigma). El clon de células con la producción más elevada (~25 µg/ml) se seleccionó para futuras transfecciones, como se describe a continuación.

**35 Ejemplo 6: Generación de PSGL-1/MIGG<sub>2B</sub> sustituido con antígenos de grupo sanguíneo A/B de tipo 3**

La línea celular CHO-K1 estable con la expresión de PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> más alta se transfectó con el vector de expresión FUT2 (gen Se), como se ha descrito anteriormente, y se seleccionó en medio que contiene G418 (400 µg/ml). El clon de células con el número relativo de antígenos de grupo sanguíneo H de tipo 3 más elevado sobre PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> se transfectó con los vectores de expresión GalNAcT (gen A) o GalT (gen B), y se seleccionó en medio que contiene blasticidina, para generar líneas celulares que producen antígenos de tipo 3 del grupo sanguíneo A y B, respectivamente, sobre PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> (véase esquema de transfección).

**45 Ejemplo 7: Generación de PSGL-1/MIGG<sub>2B</sub> sustituido con antígenos de grupo sanguíneo A/B de tipo 2**

La línea celular CHO-K1 estable con la expresión de PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> más alta se transfectó con los vectores de expresión β1,6GlcNAcT1 (enzima de 2 núcleos) y FUT1 (gen H), y se seleccionó en medio que contiene G418 (400 µg/ml). El clon de células con el número relativo de antígenos de grupo sanguíneo H de tipo 2 más elevado sobre PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> se transfectó con los vectores de expresión α1, 3 GalNAcT (gen A) o α1, 3 GalT (gen B), y se seleccionó en medio que contiene blasticidina, para generar líneas celulares que producen antígenos de tipo 2 del grupo sanguíneo A y B, respectivamente, sobre PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> (véase esquema de transfección).

**55 Ejemplo 8: Generación de PSGL-1/MIGG<sub>2B</sub> sustituido con antígenos de grupo sanguíneo A/B de tipo 1**

El clon de células con el número relativo de antígenos de grupo sanguíneo H de tipo 3 más elevado sobre PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> se transfectó con los vectores de expresión β1,3GlcNAcT (enzima de 3 núcleos) y GalT5, y se seleccionó en medio que contiene zeocina. El clon de células con el número relativo de antígenos de grupo sanguíneo H de tipo 1 más elevado sobre PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> se transfectó con los vectores de expresión α1, 3 GalNAcT (gen A) o α1, 3 GalT (gen B), y se seleccionó en medio que contiene blasticidina, para generar líneas celulares que producen antígenos de tipo 1 del grupo sanguíneo A y B, respectivamente, sobre PSGL-1/mlgG<sub>2b</sub> (véase esquema de transfección).

**65 Ejemplo 9: purificación de HPSGL-1/EK/MIGG 2B recombinante**

El sobrenadante de los cultivos celulares se limpió de restos celulares por centrifugación, y se pasó a través de una

columna que contiene IgG de cabra contra ratón (molécula entera)-agarosa (Sigma). Después de lavar con PBS, el hPSGL-1/EK/mIgG<sub>2b</sub> unido se eluirá con NaSCN 3 M y se dializará contra agua destilada. Para retirar los contaminantes de bajo peso molecular, el hPSGL-1/EK/mIgG<sub>2b</sub> se puede purificar adicionalmente mediante filtración en gel en una columna HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR (Amersham Bioscience).

5

#### *Acoplamiento covalente a sefarosa y empaquetamiento de la columna*

Las mucinas purificadas del grupo sanguíneo A y B se acoplarán covalentemente a perlas de sefarosa de flujo rápido usando la química de bioconjugación habitual. Después del acoplamiento, la sefarosa se empaquetará en un contenedor de plástico que constituye la columna en sí.

10

#### *Eficacia de adsorción y prueba de biocompatibilidad del prototipo de la columna*

Los títulos de anticuerpos ABO contra el grupo sanguíneo antes y después de la adsorción de plasma del grupo sanguíneo O reunido se valorará mediante técnicas habituales de los bancos de sangre incluyendo hemaglutinación y la prueba de anti-globulina indirecta. Las proteínas plasmáticas, incluyendo inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA), factores/fragmentos del complemento (C3, C3a, C3d, C4 y sC5b-9), complejos inmunitarios, y factores de coagulación (FVIII, protrombina, fibrinógeno, productos de degradación de la fibrina) se medirán todas mediante técnicas habituales. Las especificidades de los anticuerpos ABO adsorbidos y eluidos, y no adsorbidos se determinarán por ELISA usando mucinas recombinantes que portan antígenos del grupo sanguíneo A/B sobre cadenas principales de sacáridos definidos o mediante un ensayo de solapamiento basado en cromatografía de capa fina en el que se usan glicolípidos del grupo sanguíneo A y B purificados y estructuralmente definidos.

15

20

#### **Ejemplo 10: Producción de perlas de tamaños y colores diferentes para la determinación de los títulos del anticuerpo**

25

Se produjeron perlas micromod Partikeltechnologie GmbH de diferentes tamaños y colores en Rostock, Alemania y se conjugaron a antígenos de grupo sanguíneo de diferentes tipos. Las perlas se analizaron por citometría de flujo y presentaban una buena resolución tanto en lo concerniente al tamaño como al color (véase Figura 5). Usando este procedimiento es posible utilizar una mezcla de un mayor número de perlas conjugadas donde cada combinación de tamaño-intensidad de color representa un antígeno de grupo sanguíneo específico sobre una estructura principal específica.

30

#### **Ejemplo 11: Detección de anticuerpos de grupo sanguíneo**

35

Muestras de suero se diluyeron a 1:10 en PBS con albúmina humana al 0,5% y se mezclaron con microperlas de látex (4,6 µm; 18 µg de peso en seco) que portan oligosacáridos antigénicos de grupo sanguíneo. El suero y las microperlas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y a continuación se lavaron con HAS/PBS al 0,5%. La IgM contra ser humano marcada con FITC y la IgG marcada con PE se añadieron a las microperlas lavadas y se analizaron por citometría de flujo.

40

**REFERENCIAS**

- 1) L Rydberg *Transfus Med* 2001; 11:325-342
- 2) KI Welsh, M van Dam, CG Koffman *Transplant Proc* 1987; 19:4565-4567
- 5 3) K Tanabe, K Takahashi, T Agishi, H Toma, K Ota *Transfus Sci* 1996;17: 455-462
- 4) K Takahashi *Acomodation in ABO-incompatible kidney transplantation*: Elsevier, Amsterdam; 2004.
- 5) MD Stegall, PG Dean, JM Gloor *Transplantation* 2004; 78: 635-640
- 6) CJ Sonnenday, DS Warren, M Cooper, y col. *Am J Transplant* 2004; 4: 1315-1322
- 7) G Tyden, G Kumlien, H Genberg, J Sandberg, T Lundgren, I Fehrman *Am J Transplant* 2005; 5: 145-148
- 10 8) DS Warren, AA Zachary, CJ Sonnenday, y col. *Am J Transplant* 2004; 4: 561-568
- 9) H Clausen, S Hakomori *Vox Sang* 1989; 56: 1-20
- 10) R Oriol, J Danilovs, HR Hawkins *A J Hum Genet* 1981; 33
- 11) F Yamamoto *Immunohematol* 2004; 20: 3-22
- 12) K Furukawa, MJ Mattes, KO Lloyd *J Immunol* 1995; 135: 4090-4094
- 15 13) M Mammen, S Choi, G Whitesides *Angew Chem Int Ed* 1998; 37: 2754-2794
- 14) JC Löflying, E Hauzenberger, J Holgersson *Glycobiology* 2002; 12: 173-182
- 15) J Liu, A Gustafsson, ME Breimer, A Kussak, J Holgersson *Glycobiology* 2005; 15: 571-583
- 16) J Liu, A Weintraub, J Holgersson *Xenotransplantation* 2003; 10:149-163
- 17) J Liu, Y Qian, J Holgersson *Transplantation* 1997;63: 1673-1682
- 20 18) L Rydberg, A Bengtsson, O Samuelsson, K Nilsson, ME Breimer *Transpl Int* 2005; 17: 666-672
- 19) G Tyden, G Kumlien, I Fehrman *Transplantation* 2003; 76: 730-1
- 20) G Tyden, G Kumlien, H Genberg, J Sandberg, T Lundgren, I Fehrman *Am J Transplant.* 2005; 5: 145-8.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende antígenos de grupo sanguíneo que incluyen:

- 5 A tipo 1 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R,
- A tipo 2 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R,
- A tipo 3 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R,
- 10 A tipo 4 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R,
- B tipo 1 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R,
- 15 B tipo 2 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R,
- B tipo 3 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R, y
- B tipo 4 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R

20 en los que R representa un punto adecuado para su unión a un soporte sólido.

2. Un adsorbente que comprende la composición de la reivindicación 1.

25 3. La composición de la reivindicación 1 o el adsorbente de la reivindicación 2 que comprende adicionalmente un soporte sólido al cual están unidos dichos antígenos de grupo sanguíneo y en la que el soporte sólido es una perla, preferiblemente una microperla.

30 4. La composición de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente una colección de microperlas de subtipos diferentes, donde cada subtipo está recubierto con un antígeno de grupo sanguíneo diferente, incluyendo:

- A tipo 1 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R,
- A tipo 2 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R,
- 35 A tipo 3 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R,
- A tipo 4 GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R,
- 40 B tipo 1 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R,
- B tipo 2 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R,
- B tipo 3 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R, y
- 45 B tipo 4 Gal $\alpha$ 1,3(Fuca1,2)Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R.

50 5. Un procedimiento para determinar la presencia de anticuerpos reactivos a los grupos sanguíneos en el suero de un sujeto, dicho procedimiento que comprende:

- a) el suministro de una colección de microperlas de subtipos diferentes como se define en la reivindicación 4;
- b) la adición de dicho suero procedente de dicho sujeto a dicha colección de microperlas;
- 55 c) la incubación de dicho suero y dichas microperlas durante un periodo de tiempo suficiente para que los anticuerpos contra el grupo sanguíneo en dicho suero se unan a dichos antígenos de grupo sanguíneo;
- d) la incubación de dichas microperlas con al menos un ligando marcado capaz de unirse específicamente a dichos anticuerpos contra el grupo sanguíneo unidos a dichos antígenos de grupo sanguíneo
- 60 e) la detección de la presencia de ligando marcado unido a dichos anticuerpos contra el grupo sanguíneo para determinar la presencia o ausencia de dichos anticuerpos reactivos.

65 6. El procedimiento de la reivindicación 5, donde dicha detección se realiza mediante citometría de flujo o luminex.

7. El procedimiento de la reivindicación 5, que comprende adicionalmente la etapa de extracción de dichos

componentes del suero que no se unen específicamente a dichos antígenos de grupo sanguíneo presentados sobre dichas microperlas antes de la etapa (d), o que comprende adicionalmente la etapa de extracción de ligando marcado que no se ha unido a dichos anticuerpos contra el grupo sanguíneo antes de la etapa (e).

- 5 8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho ligando es un anticuerpo o uno de sus fragmentos, y, opcionalmente, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo monovalente, y opcionalmente de manera adicional donde dicho fragmento de anticuerpo monovalente es un fragmento Fab o Fab'.
- 10 9. El procedimiento de la reivindicación 8, donde dicho fragmento Fab o Fab' se selecciona del grupo constituido por un fragmento de anticuerpo contra Fc, un fragmento de anticuerpo contra la cadena ligera kappa, un fragmento de anticuerpo contra la cadena ligera lambda, y un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla.
- 15 10. Un procedimiento para la extracción de los anticuerpos reactivos contra los grupos sanguíneos en suero, dicho procedimiento que comprende:
- a) el suministro de una colección de microperlas de subtipos diferentes como se define en la reivindicación 4;
- b) la puesta en contacto de dicho suero con dicha colección de microperlas;
- 20 c) la incubación de dicho suero y dichas microperlas durante un periodo de tiempo suficiente para que los anticuerpos contra el grupo sanguíneo en dicho suero se unan a dichos antígenos de grupo sanguíneo;
- d) la separación de dichas microperlas de dicho suero
- 25 extrayendo así dichos anticuerpos reactivos de dicho suero.
11. La composición de la reivindicación 3 ó 4, o el procedimiento de la reivindicación 5 ó 10, en los que las microperlas son de látex.
- 30 12. La composición de la reivindicación 3 ó 4, o el procedimiento de la reivindicación 5 ó 10, en los que las microperlas de al menos uno de los subtipos de antígenos de grupo sanguíneo difieren de las microperlas de al menos otro de los subtipos de grupo sanguíneo seleccionándolas para que tengan diferentes diámetros o diferentes colores.
- 35 13. La composición de la reivindicación 3 ó 4, o el procedimiento de la reivindicación 5 ó 10, en los que las microperlas de al menos uno de los subtipos de antígenos de grupo sanguíneo difieren de las microperlas de al menos otro de los subtipos de grupo sanguíneo marcándolas con diferentes marcadores, y opcionalmente en los que los marcadores son marcadores fluorescentes.
- 40 14. La composición de la reivindicación 3 ó 4, o el procedimiento de la reivindicación 5 ó 10, en los que las microperlas tienen un diámetro de 5  $\mu\text{m}$  aproximadamente, o en los que las microperlas tienen un diámetro que abarca entre 2  $\mu\text{m}$  y 15  $\mu\text{m}$  y, preferiblemente, entre 4  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ .

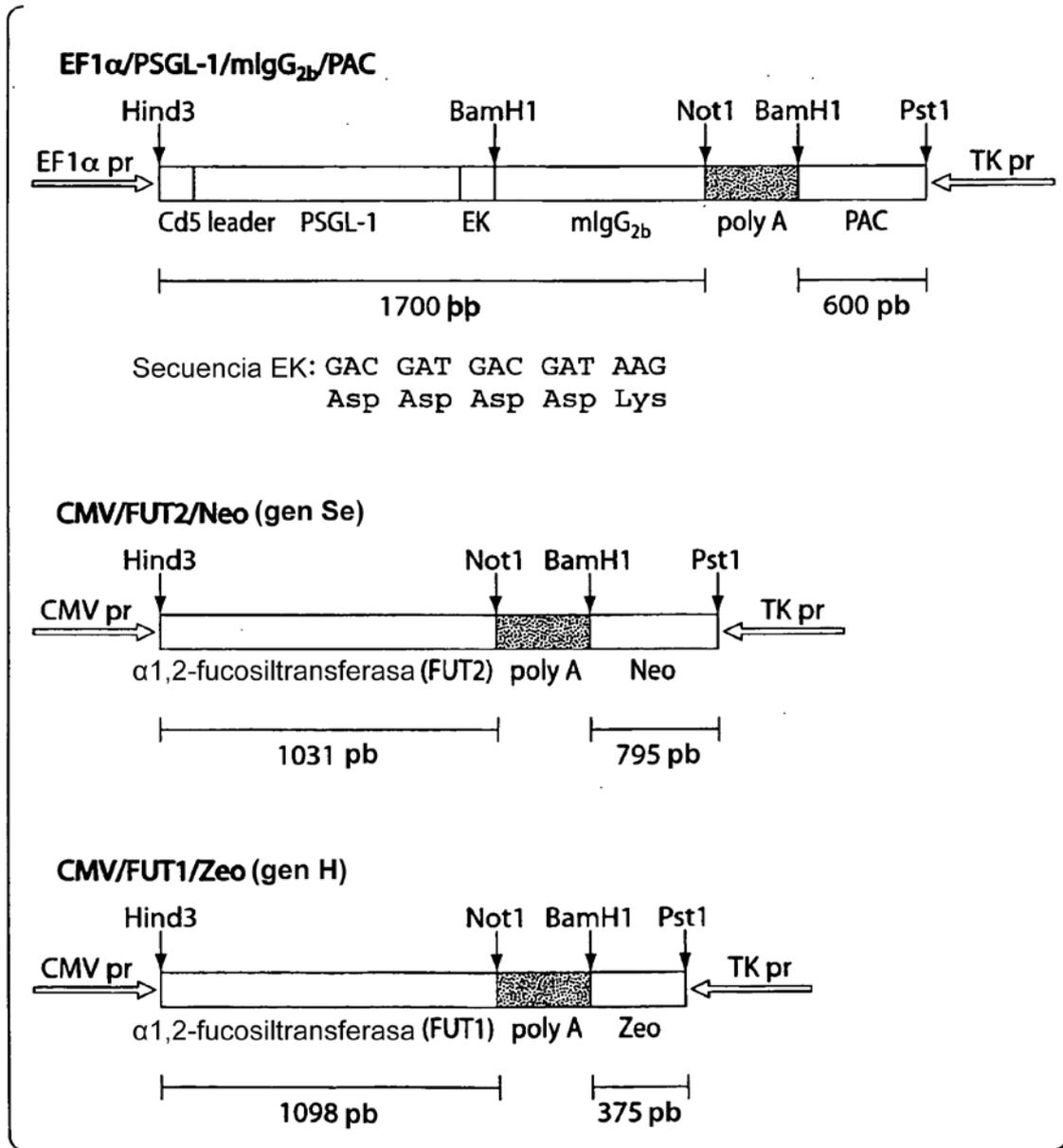


Fig. 1

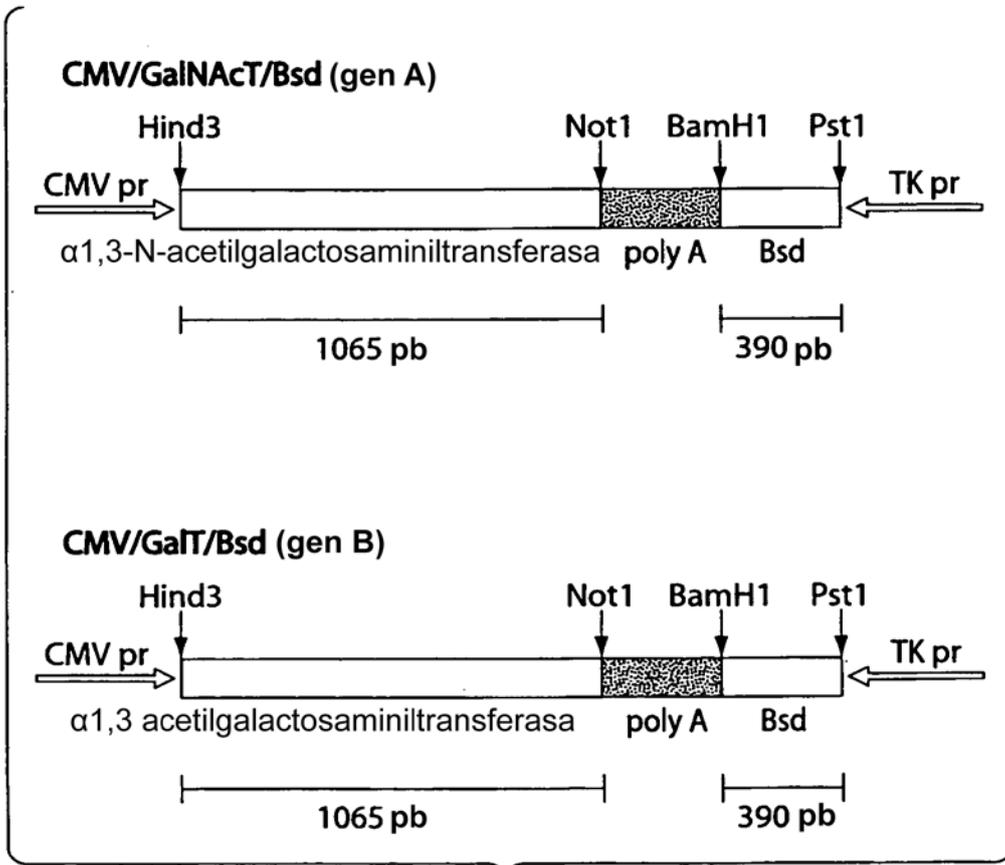


Fig. 1 Cont.

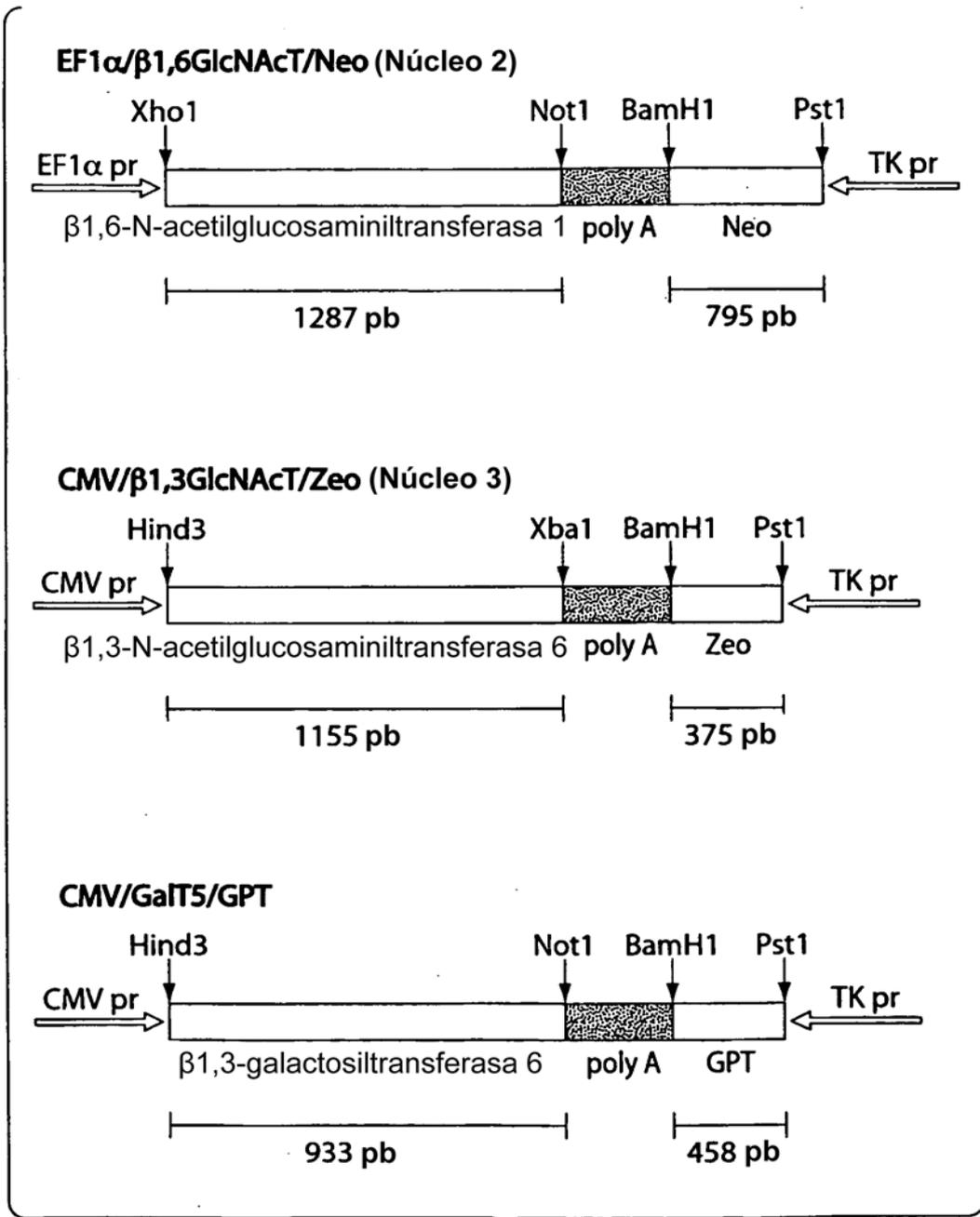


Fig. 1 Cont.

Células CHO-K1



Fig. 2

Determinantes del grupo sanguíneo A portados por diferentes cadenas principales cadenas externas

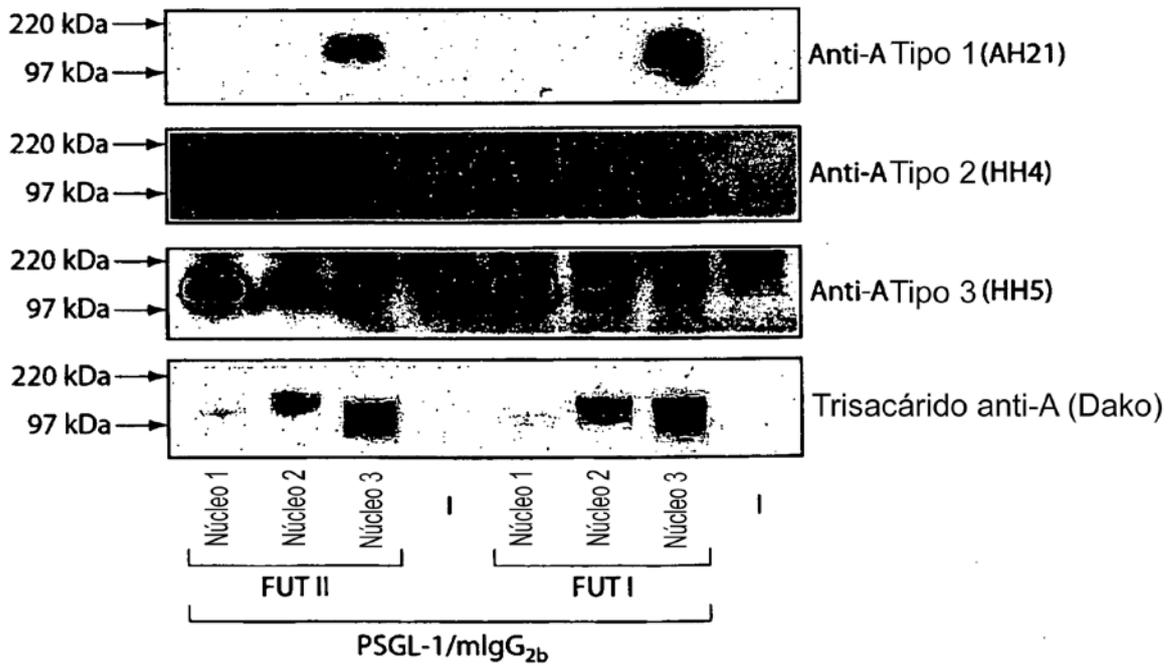
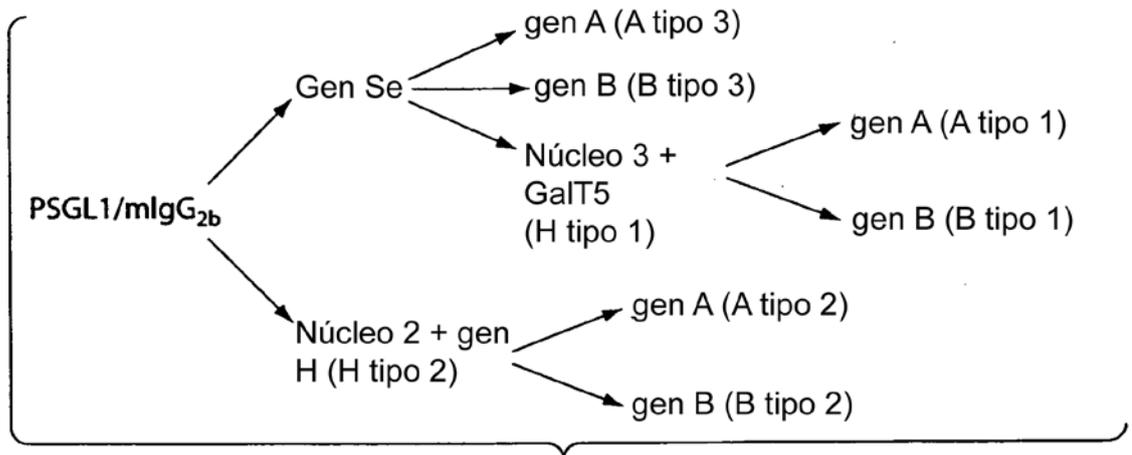


Fig. 3



**Fig. 4**

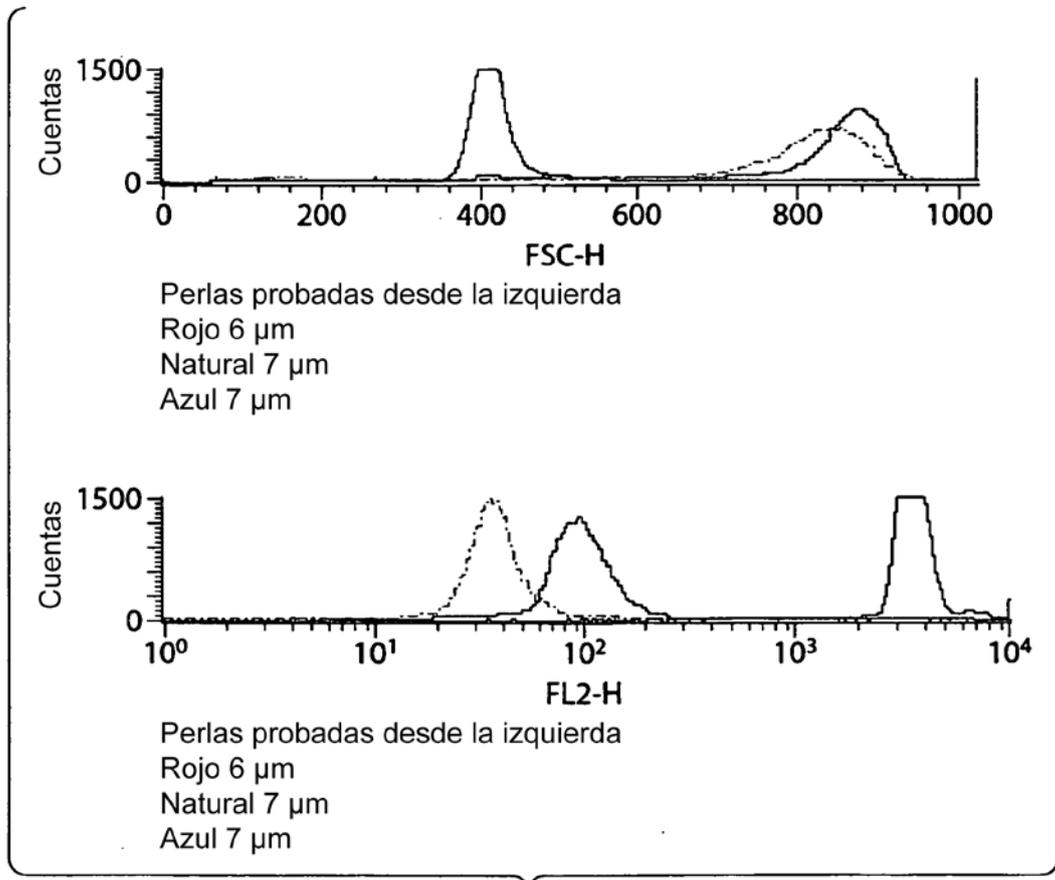


Fig. 5

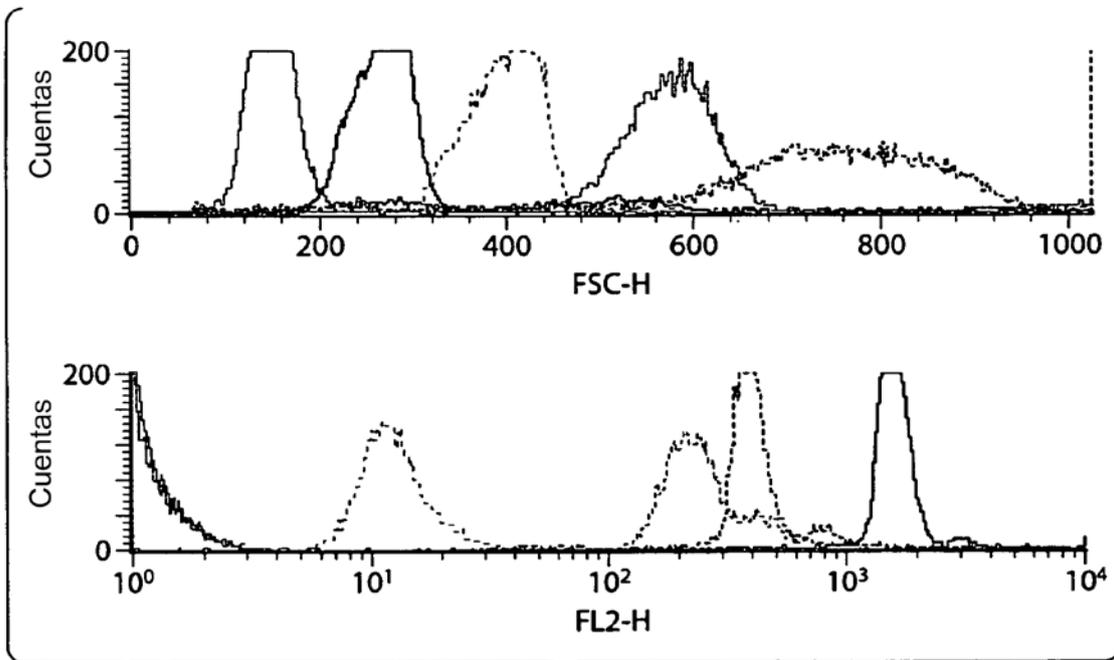


Fig. 5 Cont.

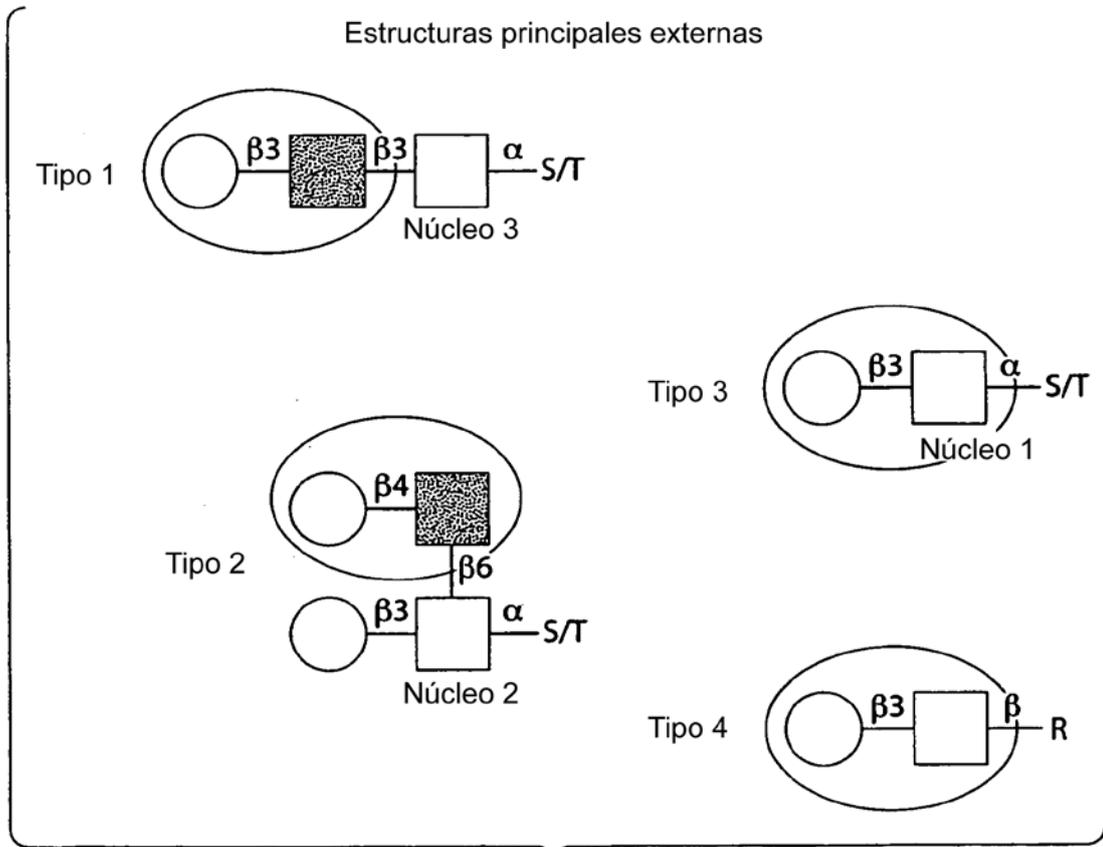


Fig. 6

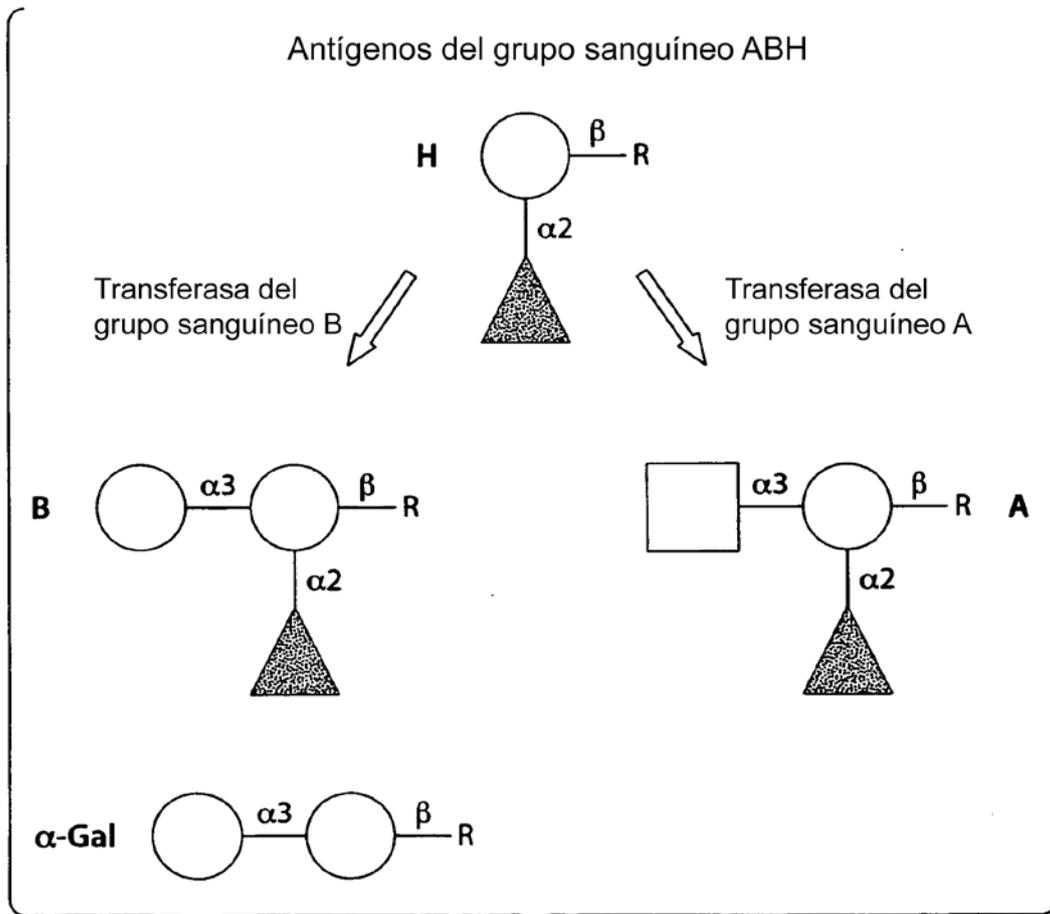


Fig. 7

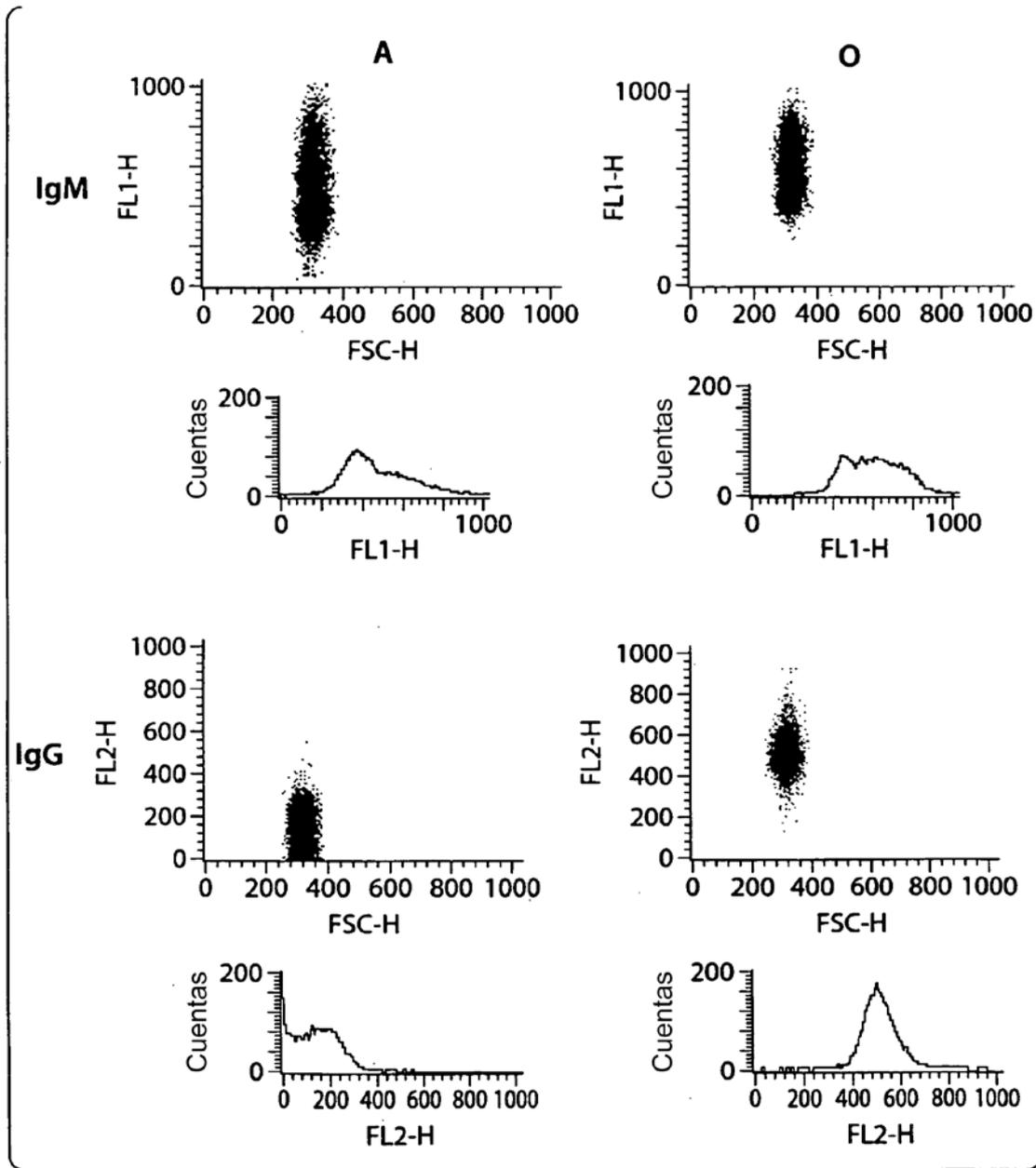


Fig. 8

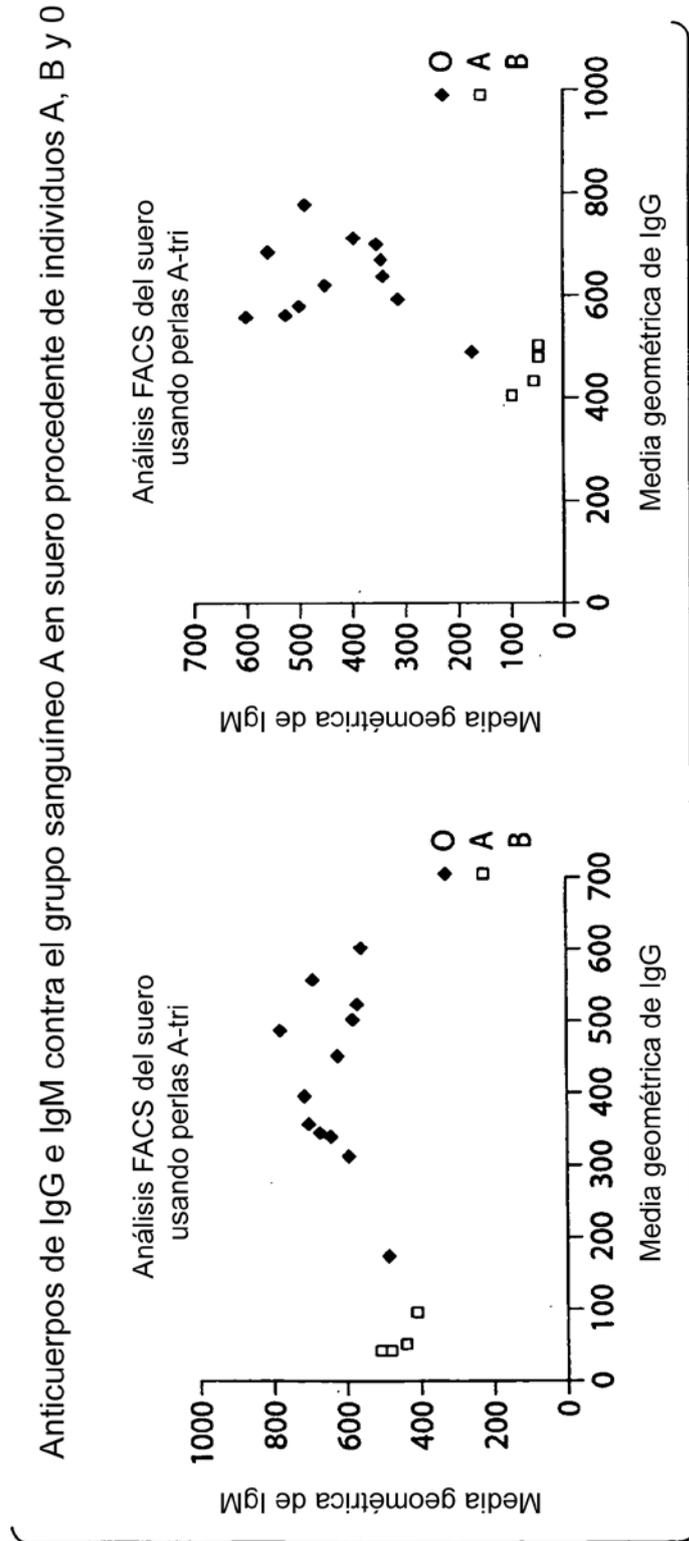


Fig. 9