

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 274**

51 Int. Cl.:
G01N 33/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03728889 .1**
96 Fecha de presentación: **14.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1509771**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.03.2005**

54 Título: **SISTEMAS Y PROCEDIMIENTO PARA IDENTIFICAR RIESGO DE TRASPLANTE DE
ÓRGANOS.**

30 Prioridad:
14.05.2002 US 380569 P
06.12.2002 US 313807

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.01.2012

73 Titular/es:
RENOVAR, INC.
505 SOUTH ROSA ROAD, SUITE 30B
MADISON, WI 53719, US

72 Inventor/es:
HU, Huaizhong;
PUCHALSKI, Alice y
AIZENSTEIN, Brian

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 372 274 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

Sistemas y procedimiento para identificar riesgo de trasplante de órganos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a los procedimientos de diagnóstico y predicción del rechazo de órganos trasplantados. En particular, la presente invención se refiere a la detección y predicción del rechazo del trasplante de riñón mediante la detección de quimiocinas (por ejemplo, CXCR3 y las quimiocinas CCL) en la orina. La presente invención se refiere además a procedimientos y composiciones para evaluar la eficacia de los agentes anti-rechazo.

10 Antecedentes de la invención

15 Anualmente se realizan alrededor de 12.000 trasplantes de riñón en los Estados Unidos. A pesar de la disponibilidad de potentes agentes inmunosupresores, el rechazo del injerto sigue siendo la principal complicación del trasplante renal. Por ejemplo, aproximadamente el 50% de todos los receptores de trasplante renal se cree que padecen al menos un episodio de rechazo del injerto. La probabilidad de la pérdida del riñón debido al rechazo es más alta durante el primer año posterior al trasplante (10-20%), pero una pequeña proporción (3,5%) de los riñones son rechazados cada año, incluso después del primer año.

20 Las estadísticas indican que el rechazo del injerto a menudo no se detecta suficientemente temprano en el episodio de rechazo para permitir el inicio del tratamiento compensatorio a tiempo para evitar el rechazo de un órgano con agentes inmunosupresores en un momento en que el proceso de rechazo puede ser efectivamente detenido y/o evitarse por completo.

25 El diagnóstico del rechazo agudo de aloinjertos clásicamente se basa en la presencia de uno o más síntomas. Por ejemplo, los síntomas del rechazo agudo de aloinjertos incluyen aumento de peso, reducción de la producción de orina, aumento de las concentraciones séricas de creatinina, hipertensión, fiebre y aumento del tamaño del injerto y la sensibilidad. Sin embargo, el uso de estos síntomas por sí solos para detectar el rechazo no es lo adecuado. En la actualidad, la mayoría de los episodios de rechazo del trasplante son detectados por la medición periódica de la función del riñón trasplantado, por ejemplo, por medio de pruebas bioquímicas, como los ensayos que miden las concentraciones séricas de creatina.

35 En la actualidad, la biopsia renal sigue siendo la prueba más definitiva para diagnosticar específicamente el rechazo del aloinjerto renal. Sin embargo, este procedimiento tiene limitaciones importantes. Por ejemplo, ya que el procedimiento de la biopsia en sí tiene complicaciones, y dado que una parte del trasplante renal se elimina durante cada una biopsia, la biopsia del trasplante no se puede realizar en una rutina o incluso con frecuencia para controlar el rechazo del aloinjerto renal. Además, la naturaleza invasiva de una biopsia renal es a la vez incómoda e inconveniente para los pacientes. La interpretación exacta de la biopsia renal del trasplante exige también la experiencia de un patólogo con amplia experiencia en el análisis de una muestra de biopsia de la evidencia del rechazo del trasplante renal. Por lo tanto, las biopsias renales se reservan para aquellos pacientes que manifiestan otras pruebas clínicas y/o de laboratorio de rechazo del injerto renal, lo que limita su uso o uso potencial en la detección precoz del rechazo del injerto.

40 Un procedimiento para la detección temprana y/o predicción del rechazo del injerto por lo tanto sería una importante herramienta clínica para mantener la viabilidad de un órgano trasplantado.

45 Descripción de la invención

50 La presente invención se refiere a los procedimientos de diagnóstico y predicción del rechazo de órganos trasplantados. En particular, la presente invención se refiere a la detección y predicción del rechazo del riñón trasplantado mediante la detección de las quimiocinas (por ejemplo, CXCR3 y las quimiocinas CCL) en la orina. La presente invención se refiere además a procedimientos y composiciones para evaluar la eficacia de los agentes anti-rechazo.

55 En consecuencia, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento de detección de marcadores de rechazo, que comprende proporcionar una muestra de orina de un sujeto, en donde dicho sujeto ha sido objeto de trasplante de órganos, los reactivos para la detección de un ligando CXCR3 o ligando del receptor CCR-5 (por ejemplo, las quimiocinas CCL), y detectar la presencia de dicho ligando en dicha muestra de orina utilizando dichos reactivos. En algunas realizaciones, el procedimiento proporciona además el paso de la predicción del riesgo de rechazo del trasplante en el sujeto basado en el resultado de la detección. En otras realizaciones, el procedimiento proporciona además la etapa de detección de riesgo de rechazo del trasplante en el sujeto basado en el resultado de la detección. La presente invención no se limita a la detección de marcadores de rechazo asociados al trasplante de un órgano en particular. De hecho, los procedimientos de la presente invención son aplicables a la

5 detección de marcadores de rechazo de los trasplantes de órganos (por ejemplo, trasplante de órgano de riñón). En algunas realizaciones, la detección de la presencia del ligando en la muestra de orina comprende detectar la cantidad de ligando en la muestra de orina. La presente invención no se limita a la detección de un ligando particular. Se contempla cualquier ligando adecuado, incluyendo pero no limitándose a, IP-10, MIG, I-TAC, MIP-1, MIP-3, y MIP-1. En algunas realizaciones, el ligando es un ligando de longitud completa. En otras realizaciones, el ligando es un fragmento del ligando de longitud completa. En algunas realizaciones, los reactivos comprenden los reactivos para la realización de un inmunoensayo. La presente invención no se limita a un inmunoensayo particular. Se contempla cualquier inmunoensayo adecuado, incluyendo pero no limitándose a, ELISA, radioinmunoensayo, inmunoensayo automatizado, ensayo de citometría de cuentas, y ensayo de inmunoprecipitación. En algunas realizaciones, el ELISA es un ensayo cuantitativo de ELISA. En algunas realizaciones, la presente invención comprende además la etapa de determinación de un tratamiento de acción basado en el riesgo de predicción de rechazo del trasplante de riñón. En algunas realizaciones, el curso de acción del tratamiento comprende la administración de la terapia anti-rechazo. En otras realizaciones, el curso de acción del tratamiento comprende la monitorización continua. En algunas realizaciones, la presente invención comprende además la etapa de determinar la presencia o ausencia de una infección concurrente en el sujeto. En algunas realizaciones, la determinación incluye la determinación de la temperatura corporal del sujeto. En otras realizaciones, la determinación incluye la detección de una infección bacteriana en el sujeto. En realizaciones adicionales, la determinación incluye la detección de una infección viral en el sujeto.

20 La presente invención proporciona un procedimiento para diagnosticar el rechazo del trasplante en un sujeto, que comprende proporcionar una muestra de orina de un sujeto, en donde el sujeto ha sido objeto de trasplante de órganos, reactivos para la detección de un ligando CXCR3 o receptor del ligando CCR-5 (por ejemplo, quimiocinas CCL), y detectar la presencia del ligando en la muestra de orina utilizando los reactivos, el rechazo del trasplante y el diagnóstico en el sujeto en función del resultado de la detección. En algunas realizaciones, la detección de la presencia del ligando en la muestra de orina comprende detectar la cantidad de ligando en la muestra de orina. La presente invención no se limita a la detección de marcadores de rechazo asociados al trasplante de un órgano en particular. De hecho, los procedimientos de la presente invención son aplicables a la detección de marcadores de rechazo de los trasplantes de órganos (por ejemplo, trasplante del órgano del riñón). La presente invención no se limita a la detección de un ligando particular. Se contempla cualquier ligando adecuado, incluyendo pero no limitándose a, IP-10, MIG, I-TAC, MIP-1, MIP-3, y MIP-1. En algunas realizaciones, el ligando es un ligando de longitud completa. En otras realizaciones, el ligando es un fragmento del ligando de longitud completa. En algunas realizaciones, los reactivos comprenden los reactivos para la realización de un inmunoensayo. La presente invención no se limita a un inmunoensayo particular. Se contempla cualquier inmunoensayo adecuado, incluyendo pero no limitándose a, ELISA, radioinmunoensayo, inmunoensayo automatizado, y el ensayo de inmunoprecipitación. En algunas realizaciones, el ELISA es un ensayo ELISA cuantitativo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de determinación de un tratamiento de acción basado en el riesgo diagnosticado de rechazo del riñón trasplantado. En algunas realizaciones, el curso de acción del tratamiento comprende la administración de la terapia anti-rechazo. En otras realizaciones, el curso de acción del tratamiento comprende la administración de un tratamiento más agresivo contra el rechazo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de determinar la presencia o ausencia de una infección concurrente en el sujeto. En algunas realizaciones, la determinación incluye la determinación de la temperatura corporal del sujeto. En otras realizaciones, la determinación incluye la detección de una infección bacteriana en el sujeto. En realizaciones adicionales, la determinación incluye la detección de una infección viral en el sujeto.

45 La presente invención proporciona además un procedimiento para determinar un tratamiento de acción, que comprende proporcionar una muestra de orina de un sujeto, en donde el sujeto ha sido objeto de un trasplante de órgano, reactivos para la detección de un polipéptido de rechazo, y detectar la cantidad de polipéptido de rechazo en la muestra de orina utilizando los reactivos, y la determinación de un tratamiento de acción basado en la detección. En algunas realizaciones, el curso de acción del tratamiento comprende la administración de la terapia anti-rechazo. En otras realizaciones, el curso de acción del tratamiento comprende la administración de terapia anti-rechazo más agresiva. En realizaciones adicionales, el curso de acción del tratamiento comprende la supervisión continua. La presente invención no se limita a la detección de marcadores de rechazo asociados al trasplante de un órgano en particular. De hecho, los procedimientos de la presente invención son aplicables a la detección de marcadores de rechazo de los trasplantes de órganos (por ejemplo, trasplante del órgano del riñón). En algunas realizaciones, el polipéptido de rechazo comprende una quimiocina. En algunas realizaciones, la quimiocina comprende un ligando CXCR3 o una quimiocina CCL. La presente invención no se limita a la detección de un ligando particular. Se contempla cualquier ligando adecuado, incluyendo pero no limitándose a, IP-10, MIG, I-TAC, MIP-1, MIP-3, y MIP-1. La presente invención no se limita a la detección de un ligando particular. Se contempla cualquier ligando adecuado, incluyendo pero no limitándose a, IP-10, MIG, I-TAC, MIP-1, MIP-3 y MP-1. En algunas realizaciones, el ligando es un ligando de longitud completa. En otras realizaciones, el ligando es un fragmento de un ligando de longitud completa. En algunas realizaciones, los reactivos comprenden los reactivos para la realización de un inmunoensayo. La presente invención no se limita a un inmunoensayo particular. Se contempla cualquier inmunoensayo adecuado, incluyendo pero no limitándose a, ELISA, radioinmunoensayo, inmunoensayo automatizado, y el ensayo de inmunoprecipitación. En algunas realizaciones, el ELISA es un ensayo cuantitativo de ELISA. En algunas

realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de determinar la presencia o ausencia de una infección concurrente en el sujeto. En algunas realizaciones, la determinación incluye la determinación de la temperatura corporal del sujeto. En otras realizaciones, la determinación incluye la detección de una infección bacteriana en el sujeto. En realizaciones adicionales, la determinación incluye la detección de una infección viral en el sujeto.

5 La presente invención también proporciona un procedimiento de clasificación de compuestos, que comprende proporcionar una muestra de un sujeto, en donde el sujeto ha sido objeto de trasplante de órganos, reactivos para la detección de un ligando CXCR3 o receptor del ligando CCR-5 (por ejemplo, las quimiocinas CCL), y uno o más compuestos de prueba, y la administración del compuesto de ensayo al sujeto; detectar la cantidad del ligando en la muestra utilizando los reactivos. La presente invención no se limita a un tipo de muestra en particular. Cualquier fluido corporal, incluyendo pero no limitándose a, sangre, orina, suero y linfa, puede ser utilizado. En algunas modalidades preferidas, la muestra es una muestra de orina. En algunas realizaciones, el compuesto de ensayo es un medicamento anti-rechazo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además el paso de determinar la eficacia de los medicamentos anti-rechazo basado en la detección. La presente invención no se limita a la detección de un ligando particular. Se contempla cualquier ligando adecuado, incluyendo pero no limitándose a, IP-10, MIG, I-TAC, MIP-1, MIP-3, y MIP-1. En algunas realizaciones, el ligando es un ligando de longitud completa. En otras realizaciones, el ligando es un fragmento de un ligando de longitud completa. En algunas realizaciones, los reactivos comprenden los reactivos para la realización de un inmunoensayo. La presente invención no se limita a un inmunoensayo particular. Se contempla cualquier inmunoensayo adecuado, incluyendo pero no limitándose a, ELISA, radioinmunoensayo, inmunoensayo automatizado, y el ensayo de inmunoprecipitación. En algunas realizaciones, el ELISA es un ensayo cuantitativo de ELISA. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de determinar la presencia o ausencia de una infección concurrente en el sujeto. En algunas realizaciones, la determinación incluye la determinación de la temperatura corporal del sujeto. En otras realizaciones, la determinación incluye la detección de una infección bacteriana en el sujeto. En realizaciones adicionales, la determinación incluye la detección de una infección viral en el sujeto.

En otras realizaciones adicionales, la presente invención proporciona un kit, que comprende los reactivos para la detección de la cantidad de un ligando CXCR3 o receptor del ligando CCR-5 (por ejemplo, quimiocinas CCL) en una muestra de orina de un sujeto sometido a trasplante de órganos, y las instrucciones para el uso de los reactivos para detectar la presencia del ligando en la muestra de orina. La presente invención no se limita a la detección de un ligando particular. Se contempla cualquier ligando adecuado, incluyendo pero no limitándose a, IP-10, MIG, I-TAC, MIP-1, MIP-3, y MIP-1. En algunas realizaciones, los reactivos comprenden los reactivos para la realización de un inmunoensayo. La presente invención no se limita a los reactivos de un inmunoensayo particular. Se contempla cualquier reactivo adecuado para inmunoensayo, incluyendo pero no limitándose a, ELISA, radioinmunoensayo, inmunoensayo automatizado, y el ensayo de inmunoprecipitación. En algunas realizaciones, el ELISA es un ensayo cuantitativo de ELISA. En algunas realizaciones, las instrucciones que comprenden instrucciones exigidos por la Food and Drug Administration para su uso en productos de diagnóstico in vitro. En algunas realizaciones, el kit comprende, además, segundos reactivos para determinar la presencia o ausencia de una infección concurrente en el sujeto y segundas instrucciones para el uso del reactivo para determinar la presencia o ausencia de la infección concurrente en el sujeto. En algunas realizaciones, las segundas instrucciones comprenden las instrucciones para determinar la temperatura corporal del sujeto. En otras realizaciones, los segundos reactivos comprenden los reactivos para la detección de una infección bacteriana en el sujeto. Todavía en otras realizaciones, los segundos reactivos comprenden los reactivos para la detección de una infección viral en el sujeto. En algunas realizaciones, las instrucciones que comprenden, además, instrucciones para usar el kit para el diagnóstico de rechazo de órganos trasplantados. En otras realizaciones, las instrucciones que comprenden, además, instrucciones para usar el kit para predecir el riesgo de rechazo de órganos trasplantados.

Descripción de la figura

50 La figura 1 muestra un diseño de experimento del procedimiento de cuentas FACS para la cuantificación de las quimiocinas IP-10, Mig e I-TAC utilizado en algunas realizaciones de la presente invención.

Descripción general de la invención

55 Las quimiocinas juegan un papel central en la fisiología de leucocitos mediante el control del tráfico basal e inflamatorio. Las quimiocinas se pueden dividir en dos categorías: las quimiocinas inducibles que reclutan leucocitos en respuesta al estrés fisiológico y quimiocinas constitutivas que son responsables de tráfico basal de leucocitos y la formación de la arquitectura de los órganos linfoides secundarios. La expresión de quimiocinas inducibles pueden ser provocada por casi cualquier estímulo que altera la homeostasis celular y el ARNm que codifica quimiocinas puede aumentar más de 300 veces a las pocas horas de su activación. Por lo tanto las quimiocinas inducibles se pueden considerar como una señal celular de los vertebrados que recluta a los leucocitos a las áreas de daño tisular (Gerard et al., Nature Immunol 2001; 2:108-115).

Las quimiocinas pueden influir en al menos tres aspectos de la biología del injerto. En primer lugar, la restauración

del flujo sanguíneo en el injerto puede conducir a la lesión por isquemia-reperusión en la que los leucocitos reclutan quimiocinas. En segundo lugar, la respuesta del huésped a la infección durante la inmunosupresión incluye quimiocinas. En tercer lugar, los componentes inflamatorios de rechazo agudo y crónico es probable que sean controlados por las quimiocinas (Gerard et al., supra).

5 En los trasplantes de corazón y de piel, se observa una de las primeras reacciones inflamatorias encontradas que se caracteriza por la infiltración de monocitos y neutrófilos. Al mismo tiempo, aparecen quimiocinas activas por neutrófilos, tales como la proteína-2 quimioatrayente de monocitos (MIP-2) y neutrófilos quimioatrayentes inducidos por citoquinas (KC), y quimiocinas activas por monocitos, tales como la proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1). Esto ocurre tanto en los trasplantes alogénicos como singénicos y es una respuesta a la reperusión isquémica. Sin embargo, varios días después de un trasplante alogénico, persiste un nuevo patrón de expresión de quimiocinas, proteína gamma-interferón-inducible (IP-10), monocinas inducidas por el interferón gamma (MIG) y un quimioatrayente interferón-inducible de células T (I-TAC), que son ligandos para CXCR3, aparecen junto con MIP-1 β y RANTES (células T normales expresadas y secretadas, reguladas tras la activación), que son ligandos para CCR5 (Yun et al., Transplantation 69:2515 [2000.]; Hancock et al., J. Exp. Med. 192:1515 [2000]). Esta variedad de quimiocinas puede ser necesaria para orquestar el movimiento de las células implicadas en el rechazo agudo. Estas células son células T CD4+ y CD8+, macrófagos, células asesinas naturales (NK) y células que presentan antígeno (APC), que transitan entre el injerto y los ganglios linfáticos regionales (Gerard et al., supra).

20 El análisis de ratones con deleciones específicas de estas quimiocinas y sus receptores ha facilitado información sobre su importancia relativa en el rechazo del aloinjerto. Por ejemplo, trasplantes cardíacos heterotópicos a través las barreras del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II sobrevivió el doble de tiempo en ratones CCR1-/- en comparación con ratones de tipo salvaje (14 frente a 7 días). Las dosis bajas de ciclosporina, que normalmente no serían suficientes para prolongar la supervivencia del injerto, producen el injerto permanente (la supervivencia más allá de 200 días) en los destinatarios CCR1-/. Además, el rechazo crónico y la arteriosclerosis del injerto no se observaron en ratones CCR1-/- tratados con ciclosporina A o anticuerpo monoclonal anti-CD4 (Yun et al., supra; Hancock et al., supra).

30 Estos análisis se han extendido a los ratones que son deficientes en CCR2, CCR5, CXCR3 e IP-10. Los receptores CCR2-/- de aloinjertos de corazón tenía un fenotipo similar al de los ratones CCR1-/. Además, su tiempo de supervivencia del injerto fue del doble en comparación con los ratones del tipo salvaje en ausencia de inmunosupresión adicional. En el mismo contexto, CCR5-/- los destinatarios mostró una triplicación del tiempo de supervivencia del injerto. Sin embargo, la mayor respuesta se observó en ratones que eran deficientes en CXCR3. En ausencia de una intervención adicional de supervivencia, el aloinjerto en ratones CXCR3-/- se extendió a 55-60 días. Una vez más, el suplemento con dosis pulsadas o bajas de ciclosporina resultaron en el injerto permanente sin evidencia de rechazo crónico o la arteriosclerosis del injerto (Gerard et al., supra; Yun et al., supra; Hancock et al., supra). En este sentido, el documento WO 01/78708 A1 describe la inhibición de rechazo del injerto través de la orientación del receptor 3 de quimiocinas Cx3C, CXCR3.

40 De los ligandos CXCR3, IP-10 aparece en el injerto 3 días después del trasplante, antes de la aparición de rechazo agudo. La presente invención no se limita a un mecanismo particular. De hecho, la comprensión de este mecanismo no es necesaria para practicar la presente invención. No obstante, se considera que esto es en respuesta a la secreción IFN- γ de las células NK cuando se encuentran con el injerto. El día 7, cuando el rechazo agudo es máximo, IP-10 comienza a disminuir, pero aparecen MIG y TAC. En comparación con los injertos de anfitriones de tipo salvaje, los de ratones CXCR3-/- en el día 7 tiene un número sustancialmente reducido de células CD4+, CD8+, CD25+ y CD45+ y la disminución de la infiltración de macrófagos (Hancock et al., supra.).

50 La importancia de las quimiocinas y los receptores de quimiocinas se observa también en los estudios sobre los trasplantes de riñón humano. RANTES es una quimiocina de células T de memoria, monocitos y eosinófilos. Expresión de RANTES se estudió en muestras de biopsia de un injerto alogénico renal. A pesar de que RANTES no se expresó en las muestras tomadas una hora después del trasplante, o en muestras de biopsia renal nativa de los pacientes con nefrotoxicidad de ciclosporina, se manifestó durante el rechazo del trasplante mediada por células. El ARNm de RANTES se detectó en la infiltración de células mononucleares y en el epitelio tubular renal, y la proteína RANTES se localizó en las células mononucleares, el epitelio tubular, y el endotelio vascular (Pattison et al., Lancet 343:209 [1994]). Las quimiocinas IP-10 (se unen al receptor CXCR3), MIP-1a y MIP-1 β (que se unen al receptor CCR5) también se encontraron que son reguladas en las biopsias de riñón sometidas a rechazo agudo. La infiltración de células inflamatorias, especialmente las células T y los macrófagos, se mostró que expresan receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR3 (Segere et al., Kidney Int. 56:52 [1999]). Además, Segerer et al. frenaron la regulación de varias quimiocinas CC y sus correspondientes receptores, de acuerdo con una reacción de tipo Th1, en el riñón de aloinjerto (Segerer et al., Am J Kidney Dis 37: 518 [2001]). Estos estudios indican la importancia de las quimiocinas y los sistemas receptores de quimiocinas en el rechazo agudo del injerto renal, y establecen una base para el uso de las quimiocinas como un indicador de rechazo agudo.

Las quimiocinas se pueden detectar en las muestras de orina de pacientes con enfermedades renales. En los

pacientes con carcinoma de células transicionales superficiales tratados con bacilos de Calmette-Guerin (BCG), una elevación significativa de IP-10, interferón- γ e IL-12 se detectó en las muestras de orina. IP-10 se piensa que es secretada en parte por células epiteliales renales, ya que las líneas de células epiteliales se mostraron que secretan IP-10 en cultivo in vitro (Poppas et al., *Urology* 52:268 [1998]). MCP-1, MIP-1a, MIP-1 β , e IP-10 se midieron en 30 pacientes con urosepsis probada en cultivo durante un seguimiento de 3 días y en 11 personas sanas después de la inyección intravenosa de endotoxina (4 ng/kg). La orina y los niveles séricos de MCP-1, MIP-1 β , e IP-10, pero no MIP-1a, estaban elevados en los pacientes al ingreso, y disminuyeron después del inicio del tratamiento antibiótico, lo que indica que la infección gram-negativa clínica y experimental en los seres humanos se asocia con una mayor producción de quimiocinas que actúan principalmente en las células mononucleares (Olszyna et al., *J. Clin Immunol.* 19:399 [1999]). Grandaliano et al. (Grandaliano et al., *Transplantation* 63:414 [1997]) han estudiado la expresión de MCP-1 en 20 receptores de trasplante renal con disfunción aguda del injerto (13 con rechazo agudo, 7 con daño tubular agudo). Se analizaron MCP-1 y la expresión de genes y proteínas por hibridación in situ e inmunohistoquímica, respectivamente. Células positivas CD68 fueron identificadas como monocitos. El número de células positivas CD-68 y la expresión de MCP-1 fueron cuantificados por un sistema de análisis de imagen computarizada. La expresión génica MCP-1, indetectable en condiciones normales de los riñones humanos, aumentó en los pacientes con rechazo agudo. MCP-1 se localizó principalmente en las células tubulares proximales y células mononucleares de infiltración. En pacientes con daño tubular agudo, MCP-1 fue significativamente menor que en el rechazo agudo, aunque superior a los controles. MCP-1 urinaria se encuentra elevada en 12 pacientes con rechazo agudo del injerto (250 ± 46 pg/mg creatinina en orina), muy superior en comparación con 13 pacientes trasplantados clínicamente estables (33 ± 9 pg/mg), y mucho mayor en comparación con 5 receptores de trasplante con daño tubular agudo (97 ± 33 pg/mg). Basándose en estos datos, se pensaba que la MCP-1 juega un papel importante en la afluencia de monocitos y el consiguiente daño tubulointerstial en el rechazo agudo. Sin embargo, el valor diagnóstico de MCP-1 urinaria para el rechazo agudo del injerto, no está bien documentada (Grandaliano et al., *Transplantation* 63:414 [1997]).

En consecuencia, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos de diagnóstico y seguimiento de rechazo del injerto que comprende la detección de las quimiocinas en la orina. En algunas realizaciones, los pacientes con riesgo de rechazo del injerto son monitorizados para detectar signos tempranos de rechazo del injerto. En otras realizaciones, los procedimientos de la presente invención se utilizan para supervisar la recuperación de rechazo del injerto tras la administración de medicamentos anti-rechazo. En realizaciones preferidas, múltiples quimiocinas se detectan al mismo tiempo.

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente invención, una serie de términos y frases que se definen a continuación:

Como se usa aquí, el término "inmunoglobulina" o "anticuerpo" se refiere a proteínas que se unen a un antígeno específico. Las inmunoglobulinas incluyen, pero no están limitadas a, los anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y humanizados, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, e incluye inmunoglobulinas de las siguientes clases: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, e inmunoglobulinas secretadas (SIG). Las inmunoglobulinas en general, constan de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras. Sin embargo, los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" también incluyen anticuerpos de cadena única y dos anticuerpos de cadena.

Como se usa aquí, el término "proteína de unión al antígeno" se refiere a las proteínas que se unen a un antígeno específico. "Las proteínas de unión al antígeno" incluyen, pero no se limitan a, las inmunoglobulinas, incluyendo anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y humanizados, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ y bibliotecas de expresión Fab; y anticuerpos de cadena única.

El término "epítipo" como se usa aquí se refiere a la porción de un antígeno que se pone en contacto con una inmunoglobulina particular.

Cuando una proteína o un fragmento de una proteína se utiliza para inmunizar a un animal huésped, numerosas regiones de la proteína pueden inducir la producción de anticuerpos que se unen específicamente a una región determinada o a la estructura tridimensional de la proteína, las regiones o estructuras se conocen como "determinantes antigénicos". Un determinante antigénico puede competir con el antígeno intacto (es decir, el "inmunógeno" que se utiliza para producir la respuesta inmune) por la unión a un anticuerpo.

Los términos "unión específica" o "unirse específicamente" cuando se utiliza en referencia a la interacción de un anticuerpo y una forma de proteína o péptido significa que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (es decir, el determinante antigénico o epítipo) en la proteína, es decir el anticuerpo está reconociendo y uniéndose a la estructura de una proteína específica en lugar de a las proteínas en general. Por ejemplo, si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una proteína que contiene un epítipo (o A libre, sin etiqueta) en una reacción que contiene la etiqueta "A" y el anticuerpo reducirá la cantidad de la etiqueta A unida al anticuerpo.

Como se usa aquí, los términos "unión no específica" y "unión de fondo" cuando se utilizan en referencia a la interacción de un anticuerpo y una proteína o péptido se refieren a una interacción que no depende de la presencia de una estructura particular (es decir, el anticuerpo es la unión a las proteínas en general, más que a una estructura particular, como un epítipo).

Como se usa aquí, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo pero no limitándose a, los seres humanos, los primates no humanos, roedores, etc., que debe ser el destinatario de una determinada prueba diagnóstica o tratamiento. Por lo general, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan indistintamente en este documento, en referencia a un ser humano.

Como se usa aquí, el término "polipéptido de rechazo" se refiere a un polipéptido que, cuando está presente en niveles elevados en un paciente (por ejemplo, en la orina de un paciente), es un indicador de rechazo de órganos trasplantados o aumento del riesgo de rechazo al órgano trasplantado. En algunas realizaciones, los polipéptidos de rechazo son las quimiocinas. En algunas realizaciones preferidas, las quimiocinas son quimiocinas CXCR3, incluyendo pero no limitándose a, IP-10, MIG, y TAC. En otras realizaciones, las quimiocinas son quimiocinas de clase CCL, que se unen al receptor CCR-5. Ejemplos de quimiocinas de clase CCL incluyen, pero no se limitan a, MIP-1, MIP-3, y MIP-1.

Como se usa aquí, el término "predecir el riesgo de rechazo del trasplante de riñón en un sujeto" se refiere a la determinación del riesgo de un sujeto de rechazar un trasplante de riñón en cualquier momento después del trasplante. En algunas realizaciones, predecir el riesgo de rechazo del trasplante de riñón se basa en "detectar la cantidad de un ligando CXCR3 en la orina de un sujeto" o "detectar la cantidad de una quimiocina CCL en la orina de un sujeto". Como se usa aquí, los términos "detectar la cantidad de un ligando CXCR3 en la orina de un sujeto" y "detectar la cantidad de quimiocinas CCL en la orina de un sujeto" se refieren a una medida cuantitativa o cualitativa de la cantidad de un determinado ligando CXCR3 o CCL en la orina de un sujeto. En algunas realizaciones, la detección utiliza "reactivos para la detección de un ligando CXCR3" o "reactivo para la detección de quimiocinas CCL".

Como se usa aquí, el término "reactivos para la detección de un ligando CXCR3" se refiere a los reactivos específicos para la detección de un determinado Ligando CXCR3 (por ejemplo, IP-10, MIG, y TAC), por ejemplo, en la orina de un sujeto. En algunas realizaciones, el reactivo es un anticuerpo específico para el ligando CXCR3. En algunas realizaciones, los reactivos comprenden, además, reactivos adicionales para la realización de ensayos de detección, incluyendo pero no limitándose a, controles, tampones, etc.

Como se usa aquí, el término "reactivos para la detección de una quimioquina CCL" se refiere a los reactivos específicos para la detección de una determinada quimiocina CCL (por ejemplo, MIP-1, MIP-3, y MIP-1), por ejemplo, en la orina de un sujeto. En algunas realizaciones, el reactivo es un anticuerpo específico para las quimiocinas CCL. En algunas realizaciones, los reactivos comprenden, además, reactivos adicionales para la realización de ensayos de detección, incluyendo pero no limitándose a, controles, tampones, etc.

Como se usa aquí, los términos "instrucciones para el uso de dicho kit para la detección de rechazo del riñón trasplantado en dicho sujeto" y "las instrucciones para el uso de dicho kit para predecir el rechazo del riñón trasplantado en dicho sujeto" incluyen instrucciones para usar los reactivos contenidos en el kit para la detección y predicción del rechazo del riñón trasplantado en una muestra de un sujeto. En algunas realizaciones, las instrucciones comprenden, además, la declaración de uso previstos requeridos por la Food and Drug Administration (FDA) US en el etiquetado de productos de diagnóstico in vitro. La FDA clasifica los diagnósticos in vitro como dispositivos médicos y requiere que sean aprobados a través del Procedimiento 510(k). La información requerida en una solicitud de conformidad 510(k) incluye: 1) El nombre del producto de diagnóstico in vitro, incluyendo el nombre comercial o de propiedad, el nombre común o usual, y el nombre de la clasificación del producto, 2) El uso previsto del producto, 3) El número de registro del establecimiento, en su caso, del propietario o agente económico que presente la presentación 510(k), la clase en la que el producto de diagnóstico in vitro fue puesto bajo la sección 513 de la Ley de FD&C, si se conoce, su panel correspondiente, o, si el dueño u operador determina que el dispositivo no ha sido clasificado en dicha sección, una declaración de que la determinación y la base para la determinación de que el producto de diagnóstico in vitro no está así clasificado, 4) Propuestas de etiquetas, el etiquetado y la publicidad suficiente para describir el producto de diagnóstico in vitro, su uso previsto, y las instrucciones de uso, incluyendo fotografías o dibujos de ingeniería, en su caso, 5) Una declaración que indique que el dispositivo es similar y/o diferente a otros productos de diagnóstico in vitro de tipo comparable en la distribución comercial en los EE.UU., junto con los datos para apoyar la declaración, 6) Un resumen 510(k) de los datos de seguridad y eficacia en que se basa la determinación de equivalencia sustancial, o una declaración de que el 510(k) de información de seguridad y eficacia que apoya el hallazgo de la FDA de equivalencia sustancial se pondrán a disposición de cualquier persona dentro de los 30 días de una solicitud por escrito; 7) Una declaración de que el remitente considera que, a su entender, todos los datos y la información presentada en la notificación previa a la comercialización es veraz y exacta y que ningún hecho material ha sido omitido, y 8) Cualquier información adicional

solicitada con respecto al producto de diagnóstico in vitro que es necesaria para que la FDA haga una determinación de equivalencia sustancial. Información adicional está disponible en la página de Internet de la FDA de los EE.UU.

5 Como se usa aquí, el término "determinación de un tratamiento de acción" como en "la determinación de un
tratamiento de acción sobre la base de dicho riesgo de rechazo predicho del trasplante de riñón" o "la determinación
de un tratamiento de acción basado en el diagnóstico de dicho rechazo del riñón trasplantado", se refiere a la
elección del tratamiento administrado a un paciente. Por ejemplo, si un paciente se encuentra con un mayor riesgo
de rechazo del órgano o de sufrir un rechazo del órgano, la terapia anti-rechazo pueden ser iniciada, el aumento o
10 cambio de un tipo de tratamiento (por ejemplo, agente farmacéutico) a otro. Por el contrario, si un paciente se
encuentra en un bajo riesgo de rechazo del órgano, la terapia anti-rechazo puede no ser administrada o los niveles
de la terapia anti-rechazo se pueden disminuir. En algunas realizaciones, el curso del tratamiento de la acción es
"monitoreo continuo" en que no se administra ningún tratamiento anti-rechazo, pero los niveles de polipéptidos de
rechazo en la orina de los pacientes se controla con regularidad (por ejemplo, utilizando los procedimientos de
15 diagnóstico de la presente invención).

Como se usa aquí, el término "determinar la eficacia de dichos medicamentos contra el rechazo en base a dicha
detección" se refiere a la determinación de si un medicamento anti-rechazo previene el rechazo del trasplante
basado en, por ejemplo, detectar el nivel de anti-polipéptido de rechazo en la orina de un paciente que ha sufrido el
20 trasplante de órganos.

Como se usa aquí, el término "memoria del ordenador" y "dispositivo de memoria del ordenador" se refiere a
cualquier medio de almacenamiento legible por un procesador del ordenador. Ejemplos de la memoria del ordenador
incluyen, pero no se limitan a, RAM, ROM, chips de ordenador, disco de vídeo digital (DVD), discos compactos (CD),
25 unidades de disco duro (HDD), y cinta magnética.

Como se usa aquí, el término "medio legible por ordenador" se refiere a cualquier dispositivo o sistema para el
almacenamiento y el suministro de información (por ejemplo, datos e instrucciones) a un procesador del ordenador.
Ejemplos de datos legibles por ordenador incluyen, pero no se limitan a, DVDs, CDs, discos duros, cintas
30 magnéticas y los servidores de transmisión a través de redes.

Como se usa aquí, los términos "tratamiento" y "unidad central de procesamiento" o "CPU" se usan indistintamente y
se refieren a un dispositivo que es capaz de leer un programa desde una memoria de ordenador (por ejemplo, ROM
o una memoria de computadora) y realizar una serie de etapas de acuerdo con el programa.

35 Como se usa aquí, el término "animales no humanos" se refiere a todos los animales no humanos, incluyendo, pero
no limitándose a, los vertebrados, como roedores, primates no humanos, ovinos, bovinos, rumiantes, lagomorfos,
porcinos, caprinos, equinos, caninos, felinos, aves, etc.

La "secuencia de aminoácidos" y términos como "polipéptido" o "proteína" no pretenden limitar la secuencia de
40 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos completa, nativa asociada con la molécula de proteína recitada.

El término "proteína nativa" como se usa aquí para indicar que una proteína no contiene residuos de aminoácidos
codificados por secuencias del vector, es decir, la proteína nativa contiene sólo los aminoácidos que se encuentran
en la proteína, como ocurre en la naturaleza. Una proteína natural puede ser producida por vía recombinante o
45 puede ser aislada de una fuente natural.

Como se usa aquí el término "porción" cuando, en referencia a una proteína (como en "una porción de una proteína
dada") se refiere a los fragmentos de la proteína. Los fragmentos pueden variar en tamaño desde cuatro residuos de
50 aminoácidos a la secuencia entera de ácido amino menos un aminoácido.

El término "Western blot" se refiere al análisis de la proteína(s) (o polipéptidos) inmovilizadas en un soporte tal como
la nitrocelulosa o una membrana. Las proteínas se ejecutan en geles de acrilamida para separar las proteínas,
seguido de la transferencia de la proteína desde el gel a un soporte sólido, como nitrocelulosa o una membrana de
nylon. Las proteínas inmovilizadas son expuestas a anticuerpos con reactividad frente a un antígeno de interés. La
55 unión de los anticuerpos puede ser detectada por varios procedimientos, incluyendo el uso de anticuerpos
radiomarcados.

Como se usa aquí, el término "in vitro" se refiere a un ambiente artificial y a los procesos o reacciones que se
60 producen dentro de un ambiente artificial. Los entornos in vitro pueden consistir, pero no se limitan a, tubos de
ensayo y cultivos de células. El término "in vivo" se refiere al medio ambiente natural (por ejemplo, un animal o una
célula) y los procesos o reacciones que se producen dentro de un entorno natural.

Los términos "compuesto de ensayo" y "compuesto candidato" se refieren a cualquier entidad química, farmacéutica,
medicamento, y similares, que es un candidato para utilizarse para tratar o prevenir una enfermedad, dolencia, o

trastorno de la función corporal (por ejemplo, el rechazo de trasplantes). Los compuestos de ensayo comprenden compuestos terapéuticos conocidos y potenciales. Un compuesto de ensayo puede determinarse que es terapéutico mediante el cribado con los procedimientos de detección de la presente invención.

5 Como se usa aquí, el término "muestra" se utiliza en su sentido más amplio. En cierto sentido, se entiende que incluye una muestra o cultivo obtenido de cualquier fuente, así como las muestras biológicas y ambientales. Las muestras biológicas pueden ser obtenidas de los animales (incluyendo humanos) e incluyen líquidos, sólidos, tejidos, y gases. Las muestras biológicas incluyen los productos de la orina y la sangre, como plasma, suero, etc. Estos ejemplos, sin embargo, no deben interpretarse como una limitación de los tipos de muestra aplicables a la
10 presente invención.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención proporciona sistemas y procedimientos para el diagnóstico del rechazo de órganos trasplantados. En particular, la presente invención proporciona procedimientos para predecir y diagnosticar el rechazo del trasplante renal basado en la presencia de polipéptidos de rechazo en los líquidos corporales (p. ej, orina). La presente invención también proporciona procedimientos de selección de medicamentos candidatos anti-rechazo por su eficacia en la prevención del rechazo del órgano.

20 La presente invención proporciona un procedimiento nuevo, no invasivo de la correlación de la presencia de ciertas quimiocinas en la orina con el rechazo del trasplante. Los procedimientos son una mejora significativa en términos de menor costo y trauma físico a un paciente. Los procedimientos de la presente invención proporcionan la ventaja adicional de permitir la prueba doméstica por los pacientes.

25 I. Detección de polipéptidos de rechazo en la orina

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para predecir y diagnosticar el rechazo de trasplantes de órganos mediante la detección de polipéptidos de rechazo en la orina. La presente invención no se limita a la detección de un polipéptido de rechazo concreto o un ensayo de detección particular. La siguiente descripción proporciona ejemplos no limitantes de polipéptidos de rechazo y los procedimientos de detección adecuados. La presente invención proporciona kits para su uso en la detección de polipéptidos de rechazo en la
30 orina.

35 A. Polipéptidos de rechazo

La presente invención proporciona procedimientos para detectar el polipéptido de rechazo en la orina. Los polipéptidos de rechazo de la presente invención se correlacionan con el rechazo de trasplantes de órganos. En algunas realizaciones, la presencia de los péptidos o una mayor cantidad de los péptidos es un indicativo de rechazo del órgano. En otras realizaciones, el aumento de polipéptidos de rechazo se correlaciona con un mayor riesgo de rechazo del trasplante. En realizaciones preferidas, la cantidad de polipéptido de rechazo es cuantificada. En algunas modalidades preferidas, un nivel cuantitativo de polipéptido de rechazo se determina que es indicativo de un mayor riesgo de rechazo del órgano o de rechazo de órganos en curso. En otras realizaciones, el nivel de polipéptido de rechazo se correlaciona con un nivel de funcionamiento de los medicamentos anti-rechazo (por ejemplo, la cantidad correcta o un medicamento funcional).
40

45 En algunas realizaciones, los polipéptidos de rechazo son las quimiocinas. En algunas realizaciones preferidas, las quimiocinas son CXCR3 quimiocinas. Las CXCR3 quimiocinas incluyen, pero no se limitan a, IL-10, MIG, y TAC. En otras realizaciones, las quimiocinas son quimiocinas CCL. Las quimiocinas CCL se unen al receptor CCR-5 e incluyen, pero no se limitan a, MIP-1, MIP-3, y MIP-1. Aún en otras realizaciones, las quimiocinas son MIP-2, MCP-2, MCP-3, RANTES e IL-8. En algunas realizaciones, los polipéptidos de rechazo son detectados directamente (por ejemplo, mediante la unión de anticuerpos para los polipéptidos de rechazo, véase, por ejemplo, la siguiente sección sobre los procedimientos de detección). En otras realizaciones, los polipéptidos de rechazo son detectados indirectamente (por ejemplo, detectando una molécula o un agente que se correlaciona con la presencia o los polipéptidos de rechazo).
50

55 La presente invención no se limita a un polipéptido de rechazo particular. Cualquier polipéptido que predice el rechazo de órganos en curso o el riesgo de rechazo futuro pueden ser utilizados. Posibles polipéptidos podrían ser identificados en base a su correlación con los individuos propensos a rechazar un órgano o que rechazan un órgano. Esta información puede ser obtenida de los estudios clínicos de pacientes sometidos a trasplante de órganos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el nivel de un posible polipéptido de rechazo en la orina de un sujeto se mide antes y después del trasplante de órganos. Los pacientes son monitoreados para el rechazo del trasplante. Los polipéptidos preferidos son los que presentan niveles más altos en la orina de los pacientes que rechazan los
60 órganos que en la orina de los pacientes que no rechazan los órganos.

La presente invención no se limita a los polipéptidos asociados con el rechazo de un órgano en particular. Se contempla que los procedimientos de la presente invención son adecuados para el monitoreo de rechazo de una amplia variedad de órganos trasplantados. En algunas modalidades preferidas, se monitoriza el rechazo del riñón. Polipéptidos descritos en este documento, así como polipéptidos adicionales, pueden ser examinados por su asociación con un trasplante de órgano en particular utilizando los procedimientos de selección descritos en este documento.

En algunas realizaciones, dos o más (por ejemplo, 3 o más, 4 o más, etc.) los marcadores de rechazo se detectan para proporcionar una evaluación de riesgos. La presencia de cada marcador puede proporcionar una respuesta más definitiva que el análisis de un marcador por sí solo. Por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 2 a continuación, la detección tanto de IP-10 e I-TAC proporciona una correlación del 100% de rechazo agudo en el grupo de pacientes evaluados.

En algunas realizaciones, se detectan ciertos niveles umbrales de un marcador particular. Si se alcanza el nivel de umbral, se observa riesgo de objeción. Por ejemplo, si se observan 100 pg/ml del marcador de rechazo (por ejemplo, IP-10, I-TAC) en la orina, se observa el riesgo. La presente invención no está limitada por el nivel del umbral utilizado en el análisis. En algunas realizaciones, el umbral es de 20 pg/ml o más, más preferiblemente, de 50 pg/ml o más, y más preferiblemente de 100 pg/ml o más, aunque se contemplan tanto valores umbral superiores como inferiores, al igual que los intervalos entre estos valores.

B. Procedimientos de detección

La presente invención proporciona procedimientos para detectar la presencia de polipéptidos de rechazo en una muestra de orina. En algunas realizaciones, se detecta el polipéptido de rechazo de longitud completa. En otras realizaciones, se detecta un fragmento o una porción de un polipéptido de rechazo. En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona, además, los procedimientos de cuantificación de la cantidad de un rechazo de polipéptidos en la orina. La presente invención no se limita a un ensayo de detección particular. Aquí se describen ensayos de detección de ejemplares.

En algunas realizaciones, se detectan polipéptidos de rechazo mediante la unión de un anticuerpo específico para la proteína (es decir, un inmunoensayo). La presente invención no se limita a un anticuerpo particular. Pueden ser utilizados los anticuerpos (por ejemplo, monoclonales o policlonales) que detectan el polipéptido de rechazo. Se describen a continuación procedimientos de ejemplo para la generación de anticuerpos.

La unión de los anticuerpos se detecta mediante técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la unión del anticuerpo se detecta mediante una técnica adecuada, incluyendo pero no limitándose a, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido por enzima), inmunoensayo "sandwich", análisis inmunorradiométrico, difusión en gel de la reacción de precipitación, ensayo de inmunodifusión, reacción de precipitación, ensayo de aglutinación (por ejemplo, el ensayo de aglutinación en gel, ensayo de hemaglutinación, etc.), ensayo de fijación del complemento, inmunofluorescencia, ensayo de proteína y ensayo de inmunoelectroforesis.

En algunas realizaciones preferidas, se utiliza un ensayo cuantitativo de ELISA (Ver por ej., las patentes US 5.958.715 y 5.484.707) En algunas realizaciones preferidas, el ELISA cuantitativo es un ELISA competitivo. En un ELISA competitivo, los pozos de la placa de microtitulación son primero recubiertos con una proteína de fusión que comprende la totalidad o un fragmento del polipéptido del rechazo (por ejemplo, un ligando CXCR3 o CCL). La muestra a analizar se añade a la placa junto con un anticuerpo específico para el polipéptido de rechazo. El polipéptido de rechazo en la muestra de orina compite por la unión con el anticuerpo con el péptido inmovilizado. La placa se lava y el anticuerpo unido al polipéptido de rechazo inmovilizado es detectado utilizando cualquier procedimiento adecuado (por ejemplo, un anticuerpo secundario que incluye una etiqueta o en grupo reactivo con un sistema de detección enzimática). La cantidad de señal es inversamente proporcional a la cantidad presente de polipéptido de rechazo en la muestra de orina (por ejemplo, la señal alta es indicativa de la poca cantidad de polipéptido de rechazo que está presente en la orina).

En algunas realizaciones, se utiliza un ensayo de detección automática. Procedimientos para la automatización de los inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes US 5.885.530, 4.981.785, 6.159.750 y 5.358.691. En algunas realizaciones, el análisis y la presentación de los resultados es también automática. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utiliza un software que genera un diagnóstico y/o pronóstico en función del nivel de polipéptidos de rechazo en la orina. En otras realizaciones, se utiliza el inmunoensayo que se describe en las patentes US 5.789.261, 5.599.677 y 5.672.480.

En otras realizaciones, es utilizado un ensayo de matriz de chip de proteínas para la detección (Véase, por ejemplo, la patente US 6.197.599). En dicho ensayo, las proteínas (por ejemplo, anticuerpos específicos para un polipéptido de rechazo) se inmovilizan en un soporte sólido, como un chip. Una muestra de orina sospechosa de contener el

polipéptido de rechazo se pasa sobre el soporte sólido. Los polipéptidos de rechazo unidos son detectados usando cualquier procedimiento adecuado. En algunas realizaciones, la detección es a través de resonancia de plasmones superficiales (SPR) (Véase, por ejemplo, WO 90/05305). En SPR, un haz de luz de una fuente de láser se dirige a través de un prisma en un biosensor que consiste en un sustrato transparente, generalmente de vidrio, que tiene una superficie exterior cubierta con una capa delgada de un metal noble, que a su vez está cubierto con una capa orgánica que interactúa fuertemente con un analito, tal como una sustancia biológica, bioquímica o química. La película orgánica contiene anticuerpos (por ejemplo, específicos para el polipéptido de rechazo de la presente invención), los cuales pueden combinarse con un analito (por ejemplo, los polipéptidos de rechazo) en una muestra para causar un aumento de grosor, lo que cambia el ángulo de SPR. Tanto mediante el control de la posición del ángulo de SPR, o la reflexión en un ángulo fijo cerca del ángulo SPR, se puede detectar la presencia o ausencia de un analito en la muestra.

En otras realizaciones, se utiliza la PROTEINCHIP (CIPHERGEN Biosystems, Fremont, CA) para la detección. El sistema PROTEINCHIP utiliza la tecnología SELDI (desorción/ionización láser de superficie mejorada) para llevar a cabo la separación, detección y análisis de las proteínas a nivel femtomol directamente a partir de muestras biológicas (Véase, por ejemplo, la patente US 6.294.790 y la solicitud de patente US 20010014461A1). En la tecnología PROTEINCHIP, proteínas de interés (por ejemplo, polipéptidos de rechazo) son capturados en la matriz de PROTEINCHIP (por ejemplo, a través de un anticuerpo unido) directamente desde la fuente original. El chip se lava para eliminar los materiales no deseados y se detectan las proteínas unidas usando SELDI.

En algunas realizaciones, se utiliza un ensayo de citometría de serie de cuentas (kit Quantum Plex, Bangs Laboratories, kit de citometría de matriz de cuentas, BD Biosciences). Estos sistemas permiten la detección de múltiples analitos con muestras de pequeño volumen.

La presente invención no se limita a la detección de polipéptidos de rechazo en la orina. Puede ser utilizado cualquier fluido corporal que contenga altos niveles de polipéptido de rechazo correlacionada con el rechazo de trasplante de órganos, incluyendo pero no limitándose a, sangre, suero, la linfa y la saliva.

En algunas realizaciones particularmente preferidas, se detecta simultáneamente una combinación de varias quimiocinas en muestras de orina. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento FACS de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para la detección simultánea de múltiples polipéptidos de rechazo. En algunas realizaciones, el procedimiento utiliza cuentas etiquetadas con tinte de fluorescencia que puede detectar múltiples quimiocinas (por ejemplo, por lo menos 3) en un ensayo. En una realización ejemplar (Ejemplo 3), el ensayo se utilizó para detectar IP-10, I-TAC y Mig. La detección de estas tres quimiocinas se llevó a cabo en el mismo tubo de ensayo al mismo tiempo como se muestra en la Figura 1. A medida que aumenta la concentración de quimiocinas, la intensidad de fluorescencia media para cada grupo de cuentas aumenta. Esta correlación entre la concentración de quimiocinas y la media de fluorescencia establece las bases para este procedimiento cuantitativo FACS. Se construyó una curva estándar para cada una de quimiocinas. Estos resultados demuestran un ensayo cuantitativo para la detección simultánea de múltiples quimiocinas.

La presente invención además no se limita a la detección directa de polipéptidos de rechazo. La presente invención contempla la detección de polipéptidos correlacionados o compuestos (por ejemplo, el ARNm del polipéptido de rechazo, metabolitos, etc.) En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona procedimientos para detectar la interacción de los polipéptidos de rechazo con los receptores de polipéptido de rechazo (por ejemplo, CXCR3 o receptores CCR-5).

C. Detección de la infección concurrente

En algunas realizaciones, los ensayos para la detección de polipéptidos de rechazo se combinan con los ensayos para la detección de infecciones concurrentes (por ejemplo, infecciones bacterianas o virales) que pueden generar resultados falso-positivos. Por ejemplo, la infección puede causar niveles elevados de quimiocinas. En algunas realizaciones, la presencia de la infección se monitoriza, junto con la presencia de quimiocinas.

En algunas realizaciones, la infección se controla por la presencia de síntomas de diagnóstico (por ejemplo, incluyendo, pero no limitados a, temperatura corporal elevada, hinchazón o enrojecimiento y dolor). En otras realizaciones, la infección se controla mediante el control de la presencia de organismos infecciosos como bacterias, virus u hongos. Todavía en otras realizaciones, la infección se controla mediante el control de la presencia de quimiocinas elevadas que se asocian con la infección, pero no con el rechazo del injerto. En otras realizaciones, la infección se controla mediante un recuento elevado de glóbulos blancos en un sujeto.

D. Kits

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona kits para la detección de polipéptidos de rechazo. En algunas realizaciones, los kits contienen anticuerpos específicos para polipéptidos de rechazo, además de los

reactivos de detección y tampones. En algunas realizaciones, los kits contienen los reactivos y/o instrucciones para las pruebas de infecciones concurrentes. En realizaciones preferidas, los kits contienen todos los componentes necesarios para llevar a cabo un ensayo de detección, incluyendo todos los controles, instrucciones para realizar los ensayos, y cualquier software necesario para el análisis y presentación de los resultados.

5 En algunas realizaciones, los kits contienen un ensayo en un formato de tiras de prueba. En estas realizaciones, el reactivo de detección (por ejemplo, anticuerpos), así como cualquier tipo de anticuerpos de control o secundarios, se fijan a un soporte sólido. En algunas realizaciones, el soporte sólido es: una tira de prueba adecuadas para la inmersión en una solución de orina (Véase, por ejemplo, patentes US 6.352.862, 6.319.676, 6.277.650, 6.258.548 y 10 6.248.596).

En algunas realizaciones, los kits se comercializan como diagnósticos in vitro. La comercialización de estos kits en los Estados Unidos requiere de la aprobación de la Food and Drug Administration (FDA). La FDA clasifica los kits de diagnóstico in vitro como dispositivos médicos. Los reglamentos 510(k) especifican las categorías de la información que debe incluirse.

15 II. Atención al paciente

La presente invención también proporciona procedimientos para proveer equipos de prueba a los pacientes en una variedad de entornos. Los kits de prueba de la presente invención son adecuados para su uso en entornos de pruebas clínicas y caseras. En las realizaciones preferidas, los kits de pruebas han sido aprobados para su venta como diagnósticos in vitro, como se describió anteriormente.

25 A. Pruebas caseras

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona kits de pruebas caseras. En realizaciones preferidas, los kits están aprobados como diagnósticos in vitro para uso en el hogar en las directrices 510(k) como se describió anteriormente. Los pacientes pueden usar kits de pruebas caseras para controlar el rechazo de órganos después de un trasplante. En algunas modalidades, los kits de prueba para uso en el hogar son más cualitativos que 30 cuantitativos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la prueba registra un resultado positivo si los niveles de la orina de un ligando CXCR3 o CCL están por encima de un nivel pre-determinado (por ejemplo, por encima de aproximadamente 100 pg/mL) o aumentar con el tiempo. En otras realizaciones, las pruebas son cuantitativas (por ejemplo, utilizando los procedimientos cuantitativos que se describieron anteriormente).

35 Por ejemplo, en algunas realizaciones, los pacientes que no reciben medicamentos contra el rechazo (por ejemplo, porque fueron determinados que no rechazarían a través de las pruebas antes o después del trasplante) monitorean los niveles en la orina de los ligandos CXCR3 o CCL. En las realizaciones preferidas, los pacientes realizar un monitoreo regular (por ejemplo, de una vez al día a una vez al mes o cada varios meses) para detectar los signos iniciales o el rechazo del órgano. En las realizaciones preferidas, los pacientes cuya nivel en orina de un ligando 40 CXCR3 o CCL está por encima de un nivel predeterminado (o cuando se registra un resultado positivo en un ensayo cuantitativo) tienen instrucciones de consultar al médico.

En otras realizaciones, los kits de prueba son utilizados por los pacientes en el hogar para controlar la eficacia de un medicamento anti-rechazo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un paciente que está tomando un medicamento 45 anti-rechazo después de trasplante de órganos controla los niveles de ligando CXCR3 y/o CCL de manera regular (por ejemplo, de una vez al día a una vez al mes o cada varios meses). Si el nivel de un paciente de un ligando CXCR3 o CCL está por encima de un nivel predeterminado (o registra un resultado positivo en un ensayo cuantitativo), puede ser indicativo de fallo orgánico causado por la falta de un nivel efectivo de un medicamento anti-rechazo. A estos pacientes se les aconseja programar un seguimiento con un profesional (por ejemplo, para ajustar 50 los niveles de medicación o cambiar a otro medicamento anti-rechazo).

B. Pruebas de base clínica

En otras realizaciones, las pruebas se realizan en un establecimiento clínico (por ejemplo, hospital o clínica). En estas realizaciones, la prueba es generalmente ordenada e interpretada por un médico u otro clínico. En algunas 55 modalidades, la prueba es llevada a cabo por un técnico de laboratorio (por ejemplo, en una interna o externa de laboratorio clínico). En las realizaciones preferidas, los ensayos clínicos utilizan un ensayo cuantitativo para la detección de un ligando CXCR3 o CCL. En algunas modalidades, la prueba se utiliza para determinar la probabilidad de rechazo de órganos en un tema que está a punto de, o acaba de, experimentar un trasplante de órganos. En 60 otras realizaciones, la prueba se utiliza para controlar el rechazo de órganos en un sujeto que ha sufrido el rechazo de órganos y no recibe medicamentos anti-rechazo. Más aún en otras realizaciones, la prueba se utiliza para monitorizar la eficacia del medicamento anti-rechazo. En algunas modalidades, la prueba se utiliza como un seguimiento a las pruebas caseras por el paciente (por ejemplo, cuando el nivel de ligando CXCR3 o CCL es elevado o si el paciente tiene otros síntomas clínicos de rechazo).

Con base en el resultado de las pruebas clínicas, la intervención apropiada es tomada (por ejemplo, incluyendo pero no limitándose a, un aumento o disminución en los niveles de medicamento contra el rechazo de la terapia, la iniciación de la terapia anti-rechazo, la finalización de la terapia contra el rechazo o monitorización continua).

5

C. Recogida casera/Pruebas Clínicas

Todavía en otras realizaciones, la prueba es proporcionada por un laboratorio clínico, pero en ausencia de una orden o interpretación médica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el paciente recoge una muestra de orina y transporta la muestra a un laboratorio clínico (por ejemplo, por correo o en persona). El laboratorio clínico, a continuación, informa el resultado al paciente. En otras realizaciones, el paciente presenta una muestra en un laboratorio clínico, la muestra se analiza y los resultados se devuelven al paciente. El paciente decide entonces, basándose en el nivel de ligando CXCR3 o CCL en la orina (o la presencia o ausencia de un resultado positivo en un ensayo cualitativo) si ponerse o no en contacto con un médico para la atención de seguimiento.

15

III. Anticuerpos

La presente invención proporciona anticuerpos aislados. En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un polipéptido aislado que comprende al menos cinco residuos de aminoácidos de un ligando CXCR3 o CCL. Estos anticuerpos son útiles en los procedimientos de diagnóstico descritos en este documento. En otras realizaciones, se utilizan los anticuerpos disponibles comercialmente (por ejemplo, disponibles a partir de cualquier fuente adecuada, incluyendo pero no limitándose a, R & D System, Minneapolis, MN).

20

Un anticuerpo contra una proteína de la presente invención puede ser cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal, siempre y cuando pueda reconocer la proteína. Los anticuerpos pueden ser producidos mediante el uso de una proteína de la presente invención, como el antígeno de acuerdo con un anticuerpo convencional o proceso de elaboración del antisuero.

25

La presente invención contempla el uso de anticuerpos monoclonales y policlonales. Cualquier procedimiento adecuado puede ser utilizado para generar los anticuerpos utilizados en los procedimientos y las composiciones de la presente invención, incluyendo pero no limitándose a, los que aquí se describen. Por ejemplo, para la preparación de un anticuerpo monoclonal, una proteína, como tal, o junto con un vehículo adecuado o diluyente se administra a un animal (por ejemplo, un mamífero) en condiciones que permitan la producción de anticuerpos. Para mejorar la capacidad de producción de anticuerpos, puede ser administrado adyuvante de Freund completo o incompleto. Normalmente, la proteína se administra una vez cada 2 semanas a 6 semanas, en total, alrededor de 2 veces a 10 veces. Animales adecuados para su uso en tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, los primates, conejos, perros, cobayas, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc.

35

Para la preparación células productoras de anticuerpos monoclonales, un animal cuyo título de anticuerpos ha sido confirmado (por ejemplo, un ratón) es seleccionado, y de 2 días a 5 días después de la inmunización final, el bazo o los ganglios linfáticos se recogen y las células productoras de anticuerpos contenidas en él se fusionan con células de mieloma para preparar el hibridoma productor de anticuerpos monoclonales deseados. Puede ser llevada a cabo la medición de los títulos de anticuerpos en el suero, por ejemplo, haciendo reaccionar la proteína marcada, como se describe más adelante y el antisuero y luego medir la actividad del agente de etiquetado unido al anticuerpo. La fusión celular puede llevarse a cabo de acuerdo con los procedimientos conocidos, por ejemplo, el procedimiento descrito por Köhler y Milstein (Nature 256:495 [1975]). Como promotor de la fusión, por ejemplo, se utiliza el polietilén glicol (PEG) o el virus de Sendai (HVJ), preferiblemente PEG.

45

Ejemplos de células de mieloma incluyen NS-1, P3U1, SP2/0, AP-1 y similares. La proporción del número de células productoras de anticuerpos (células del bazo) y el número de células de mieloma que se utilizarán preferentemente es de aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 20:1. PEG (preferiblemente PEG 1000-PEG 6000) se añade preferiblemente en una concentración de alrededor de 10% a 80%. La fusión celular puede llevarse a cabo de manera eficiente mediante la incubación de una mezcla de las células, desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 40°C, preferiblemente desde aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 37°C durante aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 10 minutos.

55

Varios procedimientos pueden ser utilizados para la detección de un hibridoma que produce el anticuerpo (por ejemplo, contra un ligando CXCR3 o CCL). Por ejemplo, cuando un sobrenadante del hibridoma se añade a una fase sólida (por ejemplo, microplaca) a la que el anticuerpo se adsorbe directamente o junto con un vehículo y una inmunoglobulina anti-anticuerpo (si las células de ratón se utilizan en la fusión celular, se utilizan anticuerpos de inmunoglobulina anti-ratón) o la proteína A marcada con una sustancia radioactiva o se añade una enzima para detectar el anticuerpo monoclonal contra la proteína unida a la fase sólida. Alternativamente, el sobrenadante del hibridoma se añade a una fase sólida a la que un anticuerpo anti-inmunoglobulina o una proteína A es adsorbida y

60

luego la proteína marcada con una sustancia radiactiva o una enzima se añade para detectar el anticuerpo monoclonal contra la proteína unida a la en fase sólida.

5 La selección de los anticuerpos monoclonales puede llevarse a cabo de acuerdo con cualquier procedimiento conocido o su modificación. Normalmente, se emplea un medio de células animales a los que se añade HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Cualquier medio de selección y crecimiento puede ser empleado siempre que el hibridoma pueda crecer. Por ejemplo, RPMI 1640 que contiene de un 1% a 20%, preferiblemente del 10% al 20% de suero fetal bovino, medio GIT que contiene de un 1% a 10% de suero fetal bovino, un medio libre de suero para el cultivo de un hibridoma (SFM-101, Nissui Seiyaku) y similares pueden ser utilizados. Normalmente, el cultivo se
10 lleva a cabo a 20°C a 40°C, preferiblemente a 37°C durante de 5 días a 3 semanas, preferiblemente de 1 semana a 2 semanas bajo aproximadamente 5% de gas CO₂. El título de anticuerpos del sobrenadante de cultivo de hibridomas se puede medir de acuerdo con la misma forma descrita anteriormente con respecto a los títulos de anticuerpos de la anti-proteína en el antisuero.

15 La separación y purificación de un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, en contra de un ligando CXCR3 o CCL) puede llevarse a cabo de acuerdo con la misma forma que los anticuerpos policlonales convencionales tales como la separación y purificación de inmunoglobulinas, por ejemplo, la sal de salida, precipitación alcohólica, precipitación de punto isoeléctrico, electroforesis, adsorción y desorción con intercambiadores de iones (por ejemplo, DEAE), ultracentrifugación, filtración en gel, o un procedimiento de purificación específico en el que sólo un anticuerpo se
20 recoge con un adsorbente tal como una fase sólida activa de unión al antígeno, proteína A o proteína G y disociando la unión para obtener el anticuerpo.

Los anticuerpos policlonales se puede preparar por cualquier procedimiento conocido o modificaciones de estos procedimientos, incluyendo la obtención de los anticuerpos de los pacientes. Por ejemplo, se prepara un complejo
25 de un inmunógeno (un antígeno contra la proteína) y una proteína transportadora, y un animal se vacuna mediante el complejo de acuerdo con la misma forma que la descrita anteriormente con respecto a la preparación de anticuerpos monoclonales. Un material que contiene el anti-anticuerpo se recupera a partir del animal inmunizado y el anticuerpo se separa y se purifica.

30 En cuanto a la complejidad del inmunógeno y la proteína transportadora a ser utilizada para la inmunización de un animal, cualquier proteína, y cualquier proporción de mezcla del transportador y un hapteno se pueden emplear en tanto que un anticuerpo contra el hapteno, que es reticulado en el transportador y utilizado para la inmunización, se produzca de manera eficiente. Por ejemplo, la albúmina de suero bovino, cicloglobulina bovina, hemocianina de lapa, etc. puede ser acoplado a un hapteno en una proporción de peso de alrededor de 0,1 partes a cerca de 20
35 partes, de preferencia, de una porción a cerca de 5 partes por 1 parte del hapteno.

Además, varios agentes de condensación pueden ser utilizados para el acoplamiento de un hapteno y un transportador. Por ejemplo, glutaraldehído, carbodiimida, éster activado maleimida, reactivos éster activados que contienen el grupo tiol o grupo ditiopiridil, y similares encuentran uso con la presente invención. El producto de
40 condensación, como tal, o junto con un transportador o diluyente adecuado se administra a un sitio de un animal que permite la producción de anticuerpos. Para mejorar la capacidad de producción de anticuerpos, puede ser administrado adyuvante de Freund completo o incompleto. Normalmente, la proteína se administra una vez cada 2 semanas a 6 semanas, en total, alrededor de 3 veces a 10 veces.

45 El anticuerpo policlonal se recupera de la sangre, ascitis y similares, de un animal inmunizado por el procedimiento anterior. El título de anticuerpos en el suero puede ser medido de acuerdo con la misma forma que la descrita anteriormente con respecto al sobrenadante del cultivo del hibridoma. La separación y purificación de los anticuerpos puede llevarse a cabo de acuerdo con la misma separación y purificación de inmunoglobulinas que se ha descrito anteriormente en relación con el anticuerpo monoclonal.
50

La proteína se utiliza aquí como el inmunógeno no se limita a un determinado tipo de inmunógeno. Por ejemplo, un polipéptido ligando CXCR3 o CCL (incluyendo además un gen que tiene una secuencia de nucleótidos alterados en parte) se puede utilizar como inmunógeno. Además, pueden ser utilizados fragmentos de la proteína. Los fragmentos pueden ser obtenidos por cualquier procedimiento, incluyendo pero no limitándose a expresar un
55 fragmento del gen, el procesamiento enzimático de la proteína, la síntesis química, etc.

IV. Detección de medicamentos

60 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona pruebas de detección de medicamentos (por ejemplo, para la detección de medicamentos anti-rechazo). Los procedimientos de detección de la presente invención utilizan la detección de un ligando CXCR3. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para la detección de compuestos que alteran (por ejemplo, aumentan o disminuyen) la expresión del ligando CXCR3 o CCL. En algunas realizaciones, el nivel de un ligando CXCR3 o CCL se detecta (por ejemplo, utilizando un procedimiento descrito en este documento) en un sujeto que ha sido objeto de trasplante de órganos

antes y después de la administración de un compuesto anti-rechazo candidato. El aumento del nivel de un ligando CXCR3 o CCL es indicativo de un compuesto candidato que no está previniendo el rechazo. Por el contrario, los compuestos preferidos son los candidatos que impiden la elevación de los niveles ligando CXCR3 o CCL.

5 En algunas realizaciones, los ensayos de detección de medicamentos se llevan a cabo en animales. Cualquier animal adecuado puede ser utilizado, incluido, pero no limitado a, babuinos, rhesus y otros monos, ratones o ratas. Modelos de animales de rechazo del trasplante se generan (por ejemplo, mediante la realización de los trasplantes de riñones o de otros órganos en los animales o por la administración de compuestos de activación del rechazo) y se mide el efecto de los medicamentos candidatos en el rechazo a los animales. En realizaciones preferidas, se mide el rechazo del trasplante en los animales detectando los niveles de polipéptidos de rechazo en la orina de los animales. El nivel de polipéptidos de rechazo puede ser detectado mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo pero no limitándose a, los que aquí se describen.

15 Experimental

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas y los aspectos de la presente invención y no deben interpretarse como una limitación de su alcance.

20 Ejemplo 1

Correlación de orina IP-10 con el rechazo del injerto

25 En este ejemplo se describe la correlación de los niveles urinarios de IP-10 con el rechazo del injerto renal en sujetos humanos. Se utilizaron cuarenta y cinco seres humanos que se habían sometido a trasplante de riñón. Se midieron los niveles de IP-10 en orina varias veces después de un trasplante de órganos. IP-10 se midieron los niveles mediante un ensayo ELISA sándwich colorimétrico cuantitativo (R & D Systems, Minneapolis, MN). Los sujetos fueron divididos en dos grupos, que rechazan y que no rechazan, sobre la base de las biopsias renales. Las biopsias fueron clasificadas utilizando criterios de Banff (Solez et al., *Kidney Int.*, 44:411 [1993]). Todos los sujetos estaban recibiendo terapia anti-rechazo en el momento del estudio. La orina de diez sujetos normales (no trasplantados) también fue comprobada.

35 En la mayoría de los que no rechazan, los niveles de IP-10 se mantuvieron en un nivel constante, bajo o que disminuía con el tiempo. En los que rechazan, los niveles de IP-10 se mantuvieron en un nivel constante, alto o que aumentaba con el tiempo. Un nivel en la orina de IP-10 mayor de aproximadamente 100 pg/ml se asoció con el rechazo del órgano. No había IP-10 detectable en ninguna de las muestras de control normales. Este ejemplo demuestra que los niveles de IP-10 se correlacionan con el rechazo del riñón trasplantado.

40 Los experimentos realizados durante el desarrollo de la presente invención también demostraron una correlación entre las quimiocinas CCL y el rechazo. Por ejemplo, se observaron correlaciones para las quimiocinas CCL MIP-1, MIP-3, y MIP-1.

Ejemplo 2

45 Correlación de quimiocinas urinarias con el rechazo del injerto y tratamiento

50 El ejemplo describe la correlación de los niveles de quimiocinas urinarias con el rechazo del injerto y el tratamiento. Fueron recogidas muestras de orina de individuos sanos, de receptores de trasplante renal con función estable del injerto y pacientes con rechazo agudo. Todos los pacientes con rechazo agudo fueron hospitalizados y recibieron tratamiento anti-rechazo. Las muestras de orina fueron centrifugadas, y el sobrenadante se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C. Estas muestras, después de la descongelación, fueron evaluadas mediante ELISA para la expresión de MCP-1, IP-10 y I-TAC.

Elevada expresión de quimiocinas en las muestras de orina de pacientes con rechazo agudo

55 Como se muestra en la Tabla 1, las quimiocinas IP-10 y I-TAC se incrementaron significativamente en las muestras de orina de pacientes con rechazo agudo del injerto y lesión tubular aguda, en comparación con controles sanos y pacientes con trasplante renal con otros cambios patológicos. Tal como se presenta en la Tabla 2, si fue utilizado el 100 pg/ml como el nivel de corte e IP-10 y I-TAC se considera al mismo tiempo, el 80% de las muestras de pacientes con rechazo y la lesión tubular aguda estuvieron por encima de este nivel, pero menos del 5% de los pacientes en los grupos restantes estaban por encima de este nivel. Este resultado indica que la detección de IP-10 y I-TAC en las muestras de orina refleja el rechazo agudo/lesión tubular agudo en el injerto renal.

MCP-1 también fue examinado en las muestras de orina. En la presente serie de muestras (Tabla 1), MCP-1 urinaria fue mayor en los pacientes con rechazo agudo o lesión tubular aguda. Sin embargo, la diferencia de niveles de

MCP-1 entre el rechazo agudo/lesión tubular aguda y el resto de grupos de pacientes no fue significativa.

Tabla 1. Niveles urinarios de quimiocinas en pacientes con trasplante de riñón

	Controles sanos (n = 10)	Otros (rechazo no-agudo/crónico; n = 16)	Rechazo crónico (n = 7)	Lesión tubular aguda (n = 3)	Rechazo agudo sospechoso (n = 7)	Rechazo agudo (n = 10) Día 1 al día 2*
IP-10 (pg/ml)	1	12	31	362	27,8	376/579
I-TAC (pg/ml)	1	21	13	75	44	94,2/168
MCP-1 (pg/ml)	269	641	1908	3226	528	2060/2473

*: Día 1 al día 2 indica el día de la biopsia/día después del día de la biopsia.

Tabla 2. Pacientes con los niveles urinarios de IP-10 y I-TAC por encima de 100 pg/ml

	Controles sanos (n = 10)	Otros (rechazo no-agudo/crónico; n = 16)	Rechazo crónico (n = 7)	Lesión tubular aguda (n = 3)	Rechazo agudo sospechoso (n = 7)	Rechazo agudo (n = 10) Día 1/día y*
IP-10	0	0	0	3	1	7,6
I-TAC	0	0	0	1	0	4,6
IP-10 o I-TAC	0	0	0	3	1	8,8

*: Día 1 al día 2 se indica el día de la biopsia/día después del día de la biopsia.

5 Retorno de los niveles de quimiocinas urinaria a la línea de base después de la resolución del rechazo agudo

Se recogieron muestras de orina diariamente de los pacientes con rechazo agudo del injerto comprobado por biopsia hasta la resolución del rechazo. Se determinaron IP-10 y I-TAC en las muestras con ELISA. IP-10 y I-TAC fueron elevados en el momento del diagnóstico, pero la disminución de los niveles después de que se inició la terapia anti-rechazo y, finalmente, regresó a la línea de base. Estos resultados indican que los niveles de quimiocinas son parámetros útiles para el control de la respuesta terapéutica a la terapia anti-rechazo. En contraste, los niveles de MCP-1 no vuelven a su nivel en al menos el 50% de los pacientes con rechazo agudo después de un tratamiento exitoso.

15 Este ejemplo indica que IP-10 y I-TAC se correlacionan con procesos de rechazo agudo en el injerto renal.

Ejemplo 3

20 Técnica basada en citometría de flujo para la cuantificación de las quimiocinas

En este ejemplo se describe un procedimiento FACS para la detección simultánea de múltiples quimiocinas. La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) utiliza cuentas etiquetadas con tinte de fluorescencia que pueden detectar tres quimiocinas en un ensayo. En este ejemplo, se han detectado IP-10, I-TAC y Mig. La detección de estas tres quimiocinas se llevó a cabo en el mismo tubo de ensayo al mismo tiempo como se muestra en la Figura 1. A medida que aumenta la concentración de quimiocinas, la intensidad de fluorescencia media para cada grupo de cuentas aumenta. Esta correlación entre la concentración de quimiocinas y la media de fluorescencia se establecen las bases para este procedimiento cuantitativo FACS. Se construyó una curva estándar para cada uno de las quimiocinas. Este ejemplo demuestra que IP-10, Mig y I-TAC pueden ser detectados a la vez en una muestra de orina.

30 Ejemplo 4

Ensayo de quimiocinas urinarias mediante la plataforma de microesferas Luminex

Este ejemplo describe la detección de los niveles de IP-10, I-TAC, y Mig utilizando un ensayo de quimiocinas de orina multiplex que utiliza la plataforma de microesferas Luminex. El protocolo utilizado fue el siguiente:

5 Una muestra 50 1 se añadió a los pocillos de una placa de 96 pocillos (incluyendo curva estándar). Se añadieron veinticinco 1 de microesferas Luminex covalentemente acopladas para capturar anticuerpos (para los ensayos multiplex, las cuentas se agruparon juntas). Las cuentas fueron incubadas en una oscuridad a temperatura ambiente durante 60 minutos en una plataforma oscilante. A continuación, se añadieron 25 1 de anticuerpos de detección con biotina (para los ensayos multiplex, los anticuerpos se agruparon). La reacción se incubó en un lugar oscuro a temperatura ambiente durante 60 minutos en una plataforma de agitación. Se añadieron veinticinco 1 de estreptavidina:PE y la reacción se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos en una plataforma de agitación. Finalmente, se añadieron 25 1 de solución de parada y los resultados fueron leídos en una máquina Luminex 100 IS (Luminex Corporation, Austin, TX). Los resultados demostraron que el ensayo de Luminex es capaz de detectar con exactitud las concentraciones de las quimiocinas en la orina.

15 Ejemplo 5

Ensayo Luminex Multiplex para la detección de quimiocinas urinarias

20 Este ejemplo describe el uso de un ensayo multiplex para la detección de las quimiocinas en la orina.

A. Procedimientos

25 Muestras de orina fueron recogidas por micción limpia de individuos sanos, de receptores de trasplante renal con función del injerto estable, de receptores con rechazo agudo y otras complicaciones. Todos los pacientes con rechazo agudo fueron hospitalizados y recibieron tratamiento anti-rechazo. Las muestras de orina fueron centrifugadas, y el sobrenadante se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C. En estas muestras, después de la descongelación, se evaluó la expresión de IP-10, Mig y TAC.

30 Establecimiento de ensayo múltiple basado en partículas del Sistema de Detección Luminex xMAP

La tecnología Luminex (Austin, TX) Multi-analyte Profiling (xMAP) está basada en microesferas de poliestireno que son internamente marcadas con dos fluoróforos diferentes. Cuando son excitados por un láser de 635 nm, los fluoróforos emiten luz en diferentes longitudes de onda, 658 y 712 nm. Mediante la variación de las tasas de emisión 35 658-nm/712-nm, pueden ser creada una serie de hasta 100 perfiles fluorescentes diferentes. Utilizando fluidos de precisión, procesadores de señal digital, y un avanzado sistema óptico, el analizador Luminex 100 clasifica cada microesfera de acuerdo con su relación predefinida de emisión fluorescente. Por lo tanto, múltiples microesferas, se pueden combinar junto a diferentes analitos en una sola muestra. Un tercer fluoróforo unido a una molécula reportera permite la cuantificación de la interacción que se ha producido en la superficie de las microesferas.

40 Un ensayo triple basado en partículas fue desarrollado para cuantificar las quimiocinas IP-10, I-TAC y Mig humanas utilizando el analizador Luminex 100. Los anticuerpos de captura dirigidos, respectivamente, a IP-10, Mig e I-TAC fueron conjugados por separado con sus cuentas correspondientes. IP-10, MiG e I-TAC estándares o muestras se añadieron y se incubaron durante 60 min. Se añadieron los anticuerpos de detección marcados con biotina y se incubaron durante 60 minutos antes de la adición de estreptavidina-PE. La adquisición y análisis de datos se realizó mediante un analizador Luminex 100. El ensayo triplex se lleva a cabo en placas de 96 pocillos, y en menos de 3 horas para llevar a cabo un experimento. La sensibilidad está a un nivel de menos de 5 pg/ml. En comparación con los procedimientos de cuantificación tradicionales como la radio-inmuno-ensayo o inmunoensayo enzimático, este ensayo triple de base de cuentas mantiene la sensibilidad y especificidad, pero es más eficiente.

50 B. Resultados

Expresión Elevada de quimiocinas en las muestras de orina de pacientes con rechazo agudo, necrosis tubular aguda o infección por virus BK

55 Utilizando en ensayo triple de cuentas, fueron examinadas las muestras de orina recogidas a partir de 70 receptores de trasplante renal. La primera muestra urinaria de cada paciente se recogió antes de que fuera tomada la biopsia renal. Para los pacientes que sufrían de rechazo agudo, se recogieron muestras en serie una vez al día hasta que el rechazo fue resuelto. Como se muestra en la Tabla 3, las quimiocinas IP-10, Mig e I-TAC aumentaron de manera significativa en las muestras de orina de pacientes con rechazo agudo del injerto, lesión tubular aguda, nefrotoxicidad por CsA, e infección por virus BK, en comparación con controles sanos y pacientes con trasplante renal con otros cambios patológicos. Además, los pacientes que tenían IP-10 o MiG urinarias superiores a 500 pg/ml eran de rechazo agudo exclusivamente (10 de 22) o necrosis tubular aguda (3 de 8). Tal como se presenta en la Tabla 4, si el 100 pg/ml se utilizó como valor de corte e IP-10 y Mig fueron consideradas al mismo tiempo, muestras

5 de pacientes con rechazo agudo (86%), lesión tubular aguda (75%), toxicidad de CsA (67%) e infección por virus BK (100%) estaban en su mayoría por encima de este nivel, pero menos del 15% de los pacientes en los grupos restantes estaban por encima de este nivel. Ninguno de los controles sanos tenían un nivel superior a 100 pg/ml de estas dos quimiocinas en sus muestras de orina. Este resultado indica que la detección de IP-10 y Mig en las muestras de orina pueden reflejar el rechazo agudo (RA), la lesión tubular aguda (NTA), la nefrotoxicidad por CsA (toxicidad CsA), y la infección por el virus BK (Virus BK) en el injerto renal con una alta sensibilidad y especificidad.

Tabla 3

Quimiocinas urinarias (pg/ml) en receptores de trasplante renal								
	Controles (n = 11)	Otros (n = 18)	CR (n = 8)	ATN (n = 8)	Sospecha de AR (n = 9)	AR (n = 22)	Virus BK (n = 3)	Toxicidad CsA (n = 3)
IP-10	18,0	51,5	37,0	554,6	47,9	610,1	307,4	737,4
Mig	12,7	35,7	29,4	419,6	51,0	553,9	266,6	350,9
I-TAC	8,0	3,4	2,2	59,4	11,9	183,9	60,5	168,7

10

Tabla 4

Receptores de trasplante renal con quimiocinas urinarias IP-10 o MiG por encima de 100 pg/ml								
	Controles (n = 11)	Otros (n = 18)	CR (n = 8)	ATN (n = 8)	Sospecha de AR (n = 9)	AR (n = 22)	Virus BK (n = 3)	Toxicidad CsA (n = 3)
IP-10	0	2	1	6	2	19	3	2
Mig	0	1	1	6	2	16	3	1
IP/10/Mig	0	2	2	6	2	19	3	2

Retorno de los niveles de quimiocinas urinarias a la línea de base después de la resolución del rechazo agudo

15

Se recogieron muestras de orina todos los días de pacientes con rechazo agudo del injerto probado mediante biopsia hasta la resolución del rechazo. Se determinaron los niveles de IP-10, Mig y I-TAC en las muestras con el ensayo triple de cuentas. IP-10 y Mig fueron elevados en el momento del diagnóstico, pero la disminución de los niveles (con excepción de un paciente) se inició después de la terapia anti-rechazo y, finalmente, regresó a la línea de base. Esto indica que estos niveles de quimiocinas son parámetros útiles para monitorizar la respuesta a la terapia anti-rechazo.

20

En conclusión, este ejemplo demuestra la utilidad de las quimiocinas de la orina en la detección de rechazo del injerto y en el seguimiento de la recuperación de rechazo del injerto. Este ejemplo también demuestra que las quimiocinas múltiples pueden ser evaluadas de forma simultánea utilizando la plataforma Luminex.

25

Varias modificaciones y variaciones del procedimiento descrito y el sistema de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de detección de marcadores de rechazo, que comprende la detección de la presencia de un ligando CXCR3, en donde dicho ligando CXCR3 es IP-10, MIG o I-TAC en una muestra de orina de un sujeto, en el que el sujeto ha sido objeto de trasplante de órganos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de predicción o detección de riesgo de rechazo agudo de trasplante en dicho sujeto en base al resultado de dicha detección.
- 10 3. Procedimiento para diagnosticar el rechazo del trasplante en un sujeto, que comprende las etapas del procedimiento según la reivindicación 1 ó 2.
- 15 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha detección de la presencia de dicho ligando CXCR3 en dicha muestra de orina comprende detectar la cantidad de dicho ligando CXCR3 en dicha muestra de orina.
5. Procedimiento según la reivindicación 3 ó 4, en el que el rechazo al trasplante comprende rechazo del riñón trasplantado.
- 20 6. Procedimiento según la reivindicación 2, que también comprende el paso de la determinación de un tratamiento de acción sobre la base de dicha predicción o diagnóstico del riesgo de rechazo de trasplante renal.
- 25 7. Procedimiento para la detección de un compuesto terapéutico, que incluye la detección de la cantidad de un ligando CXCR3 en que dicho ligando CXCR3 es IP-10, MIG o I-TAC, en una muestra de orina de un sujeto, en donde el sujeto ha sido objeto de trasplante de órganos y en el que un compuesto de ensayo tal como un compuesto candidato terapéutico se ha administrado a dicho sujeto.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicho compuesto de ensayo es un medicamento anti-rechazo.
- 30 9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, que comprende además la etapa de determinar la eficacia de dichos medicamentos contra el rechazo en base a dicha detección.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que dicho sujeto es un animal no humano.
- 35 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicho animal no humano es seleccionado del grupo que consiste de un primate no humano, un ratón y una rata.
- 40 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho ligando CXCR3 es un ligando de longitud completa.
- 45 13. Procedimiento para determinar un tratamiento de acción, que comprende:
a) detectar la cantidad de un ligando CXCR3 como se define en la reivindicación 1, en una muestra de orina de un sujeto, en donde el sujeto ha sido objeto de trasplante de órganos, y
b) determinar un tratamiento de acción basado en dicha detección.
- 50 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicho ligando CXCR3 es un polipéptido de longitud completa.
- 55 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 13 a 14, en el que dicho curso de acción del tratamiento comprende la administración de la terapia anti-rechazo.
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 13 a 15, en el que dicho curso de tratamiento de acción comprende la supervisión continua.
17. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 13, en el que el trasplante de órganos es el trasplante del órgano del riñón, o comprende un trasplante de riñón.
- 60 18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende además la etapa de determinar la presencia o ausencia de una infección concurrente en dicho sujeto.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que la determinación comprende la determinación de la temperatura del cuerpo de dicho sujeto.

20. Procedimiento según la reivindicación 18 ó 19, en el que dicha determinación comprende la detección de una infección bacteriana o viral en dicho sujeto.
- 5 21. Utilización de un kit en un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, comprendiendo dicho kit:
- a) reactivos específicos para la detección de la cantidad de un ligando CXCR3 como se define en la reivindicación 1, y
- 10 b) instrucciones para el uso de dichos reactivos específicos para la detección de la presencia de dicho ligando CXCR3 en una muestra de orina.
22. Utilización según la reivindicación 21, en el que dichos reactivos comprenden los reactivos para la realización de un inmunoensayo.
- 15 23. Procedimiento o utilización según la reivindicación 22, donde dicho inmunoensayo es seleccionado del grupo que consiste de un ELISA, radioinmunoensayo, inmunoensayo automatizado, ensayo de citometría de cuentas, y el ensayo de inmunoprecipitación.
- 20 24. Procedimiento o utilización según la reivindicación 20 ó 23, en donde el ELISA es un ensayo ELISA cuantitativo.
- 25 25. Procedimiento según la reivindicación 20 ó 23, en el que dicho ensayo es un ensayo de clasificación de células activadas por fluorescencia.
26. Procedimiento según la reivindicación 25, en el que dicho ensayo de clasificación de células activadas por fluorescencia es un ensayo cuantitativo de clasificación de células activadas por la fluorescencia.
27. Utilización según la reivindicación 21, en el que dichos reactivos comprenden los reactivos para la realización de un ensayo de clasificación de células activadas por fluorescencia.
- 30 28. Utilización según la reivindicación 27, en el que el ensayo de clasificación de células activadas por fluorescencia es un ensayo cuantitativo de clasificación de células activadas por fluorescencia.
- 35 29. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, 27 ó 28, en el que dichas instrucciones comprenden instrucciones exigidas por la Administración de Alimentos y Fármacos para su uso en productos de diagnóstico in vitro.
- 40 30. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, ó 27 a 29, que comprende además los segundos reactivos para determinar la presencia o ausencia de una infección concurrente en dicho sujeto y segundas instrucciones para el uso de dichos reactivos para determinar la presencia o ausencia de dicha infección concurrente en dicho sujeto.
- 45 31. Utilización según la reivindicación 30, en el que dichas segundas instrucciones comprenden instrucciones para determinar la temperatura del cuerpo de dicho sujeto.
- 50 32. Utilización según las reivindicaciones 30 a 31, en el que los segundos reactivos comprenden los reactivos para la detección de una infección bacteriana o viral en dicho sujeto.
33. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32, en el que dichas instrucciones comprenden, además, instrucciones de uso de dicho kit para el diagnóstico de rechazo de órganos trasplantados, o para predecir el riesgo de rechazo de trasplantes de órganos.

Figura 1

