



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 133 085**

⑫ Número de solicitud: 9700050

⑤① Int. Cl.⁶: G01N 33/564

G01N 33/58

C07K 14/725

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **30.12.96**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.99**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **16.08.99**

⑦① Solicitante/s: **HOSPITAL UNIVERSITARIO
"VIRGEN DE LA ARRIXACA"**
Insalud. Ministerio de Sanidad y Consumo
Ctra. Madrid-Cartagena, s/n
30120 El Palmar, Murcia, ES

⑦② Inventor/es: **Alvárez López, M^a Rocio;**
Minguela Puras, Alfredo y
García Alonso, Ana María

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Método de análisis del rechazo agudo en trasplante ortotópico de hígado mediante la determinación de la intensidad de expresión de las moléculas coestimuladoras (CD28, CTLA-4, CD80 y CD86) en la superficie de linfocitos de sangre periférica por citometría de flujo.**

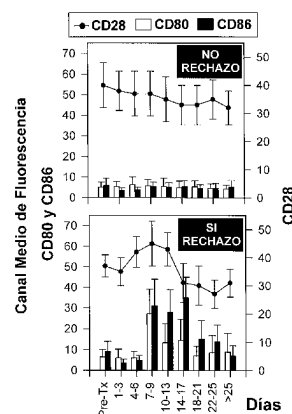
⑤⑦ Resumen:

Método de análisis del rechazo agudo en trasplante ortotópico de hígado mediante la determinación de la intensidad de expresión de las moléculas coestimuladoras (CD28, CTLA-4, CD80 y CD86) en la superficie de linfocitos de sangre periférica por citometría de flujo.

El presente descubrimiento se refiere a un nuevo procedimiento para detectar de forma precoz e incruenta el rechazo agudo tras el trasplante ortotópico de hígado, mediante el estudio de la intensidad de expresión de las moléculas coestimuladoras CD28, CTLA-4, CD80 y CD86, determinada por su canal medio de fluorescencia estimado por técnicas de citometría de flujo, en células de sangre periférica extraídas cada 3 días después del trasplante.

Aplicaciones: Este método permite la detección precoz y el tratamiento preventivo de los episodios de rechazo agudo tras el trasplante ortotópico de hígado, lo que supone la ventaja de evitar daños en el injerto y del empleo de tratamientos tardíos más agresivos.

FIGURA I



ES 2 133 085 A1

DESCRIPCION

Método de análisis del rechazo agudo en trasplante ortotópico de hígado mediante la determinación de la intensidad de expresión de las moléculas coestimuladoras (CD28, CTLA-4, CD80 y CD86) en la superficie de linfocitos de sangre periférica por citometría de flujo.

El presente descubrimiento se refiere a un nuevo procedimiento para detectar de forma temprana e incruenta el rechazo agudo del trasplante ortotópico de hígado, mediante el análisis de la expresión de las moléculas CD28, CD80 y CD86 en células de sangre periférica por técnicas de citometría de flujo.

La técnica estándar de detección del rechazo agudo de un injerto es el método anatomopatológico de biopsias realizadas a los trasplantados cuando los síntomas clínicos y bioquímicos así lo indican.

Sin embargo, la realización de la biopsia es una técnica que puede entrañar riesgo para el enfermo, a la vez que puede ocasionar molestias. Además, el método patológico no siempre es lo suficientemente preciso debido a diferentes causas, como son la calidad de la biopsia, el momento de realización de la misma o la instauración del tratamiento antirechazo previo a su realización que enmascare su aspecto. También puede haber enfermos en los que la realización de la biopsia pueda estar contraindicada, como son los casos de defectos en la coagulación sanguínea.

Por otro lado, la evolución de los parámetros bioquímicos que normalmente se emplean para el seguimiento de los receptores de trasplante ortotópico de hígado, se ven a menudo alterados por causas ajenas a la aparición del rechazo agudo, tales como la mala preservación del injerto, colestasis, infecciones virales, procesos inflamatorios y obstructivos.

El análisis de la expresión de las moléculas CD28, CD80, CD86 y otras como BLA clase-I y CTLA-4 en células de sangre periférica, permite monitorizar el estado de activación del sistema inmunológico de los receptores de injertos tan frecuentemente como sea preciso, permitiendo el análisis del rechazo agudo de una forma rápida, precoz, incruenta y de fácil realización.

El rechazo agudo evaluado por métodos clásicos puede verse apoyado, o en algunos casos incluso sustituido, por este nuevo método, debido a las siguientes características del sistema empleado, que permite:

- Predecir el rechazo precozmente, posibilitando la instauración de terapias inmunosupresoras preventivas que mejoren la aceptación del injerto.
- Determinar la eficacia del tratamiento antirechazo, ya que dicho tratamiento induce una fuerte disminución en la expresión de las moléculas estudiadas.
- Conocer el estado de activación pretrasplante del sistema inmunológico del receptor y su evolución durante el periodo posttrasplante.

- Facilitar la interpretación anatomopatológica del rechazo agudo en los casos de difícil discriminación.

- Facilitar el análisis de rechazo agudo en enfermos con contraindicaciones para la realización de la biopsia.

- Colaborar con los análisis bioquímicos en el seguimiento clínico de los trasplantados, ayudando a esclarecer casos dudosos.

- Indicar el momento adecuado de la realización de la biopsia, coincidiendo con la mayor activación del sistema inmunológico, para que el análisis anatomopatológico sea más preciso.

El objetivo de esta patente es por consiguiente, describir un método de análisis por citometría de flujo para la detección del rechazo agudo en pacientes sometidos a trasplante hepático, un sistema rápido, sencillo y que no conlleva riesgo ni molestia alguna. El método se basa en la determinación de la expresión de las moléculas coestimuladoras que participan en la respuesta contra el injerto (repuestas alogénicas), a partir de muestras de sangre periférica de fácil obtención.

Los hallazgos objeto de esta patente de aplicación clínica, cuyo contenido se resume en la figura 1, consiste en la detección de un aumento de la expresión de las moléculas CD28, CTLA-4, CD80 y CD86 sobre células de sangre periférica medida mediante técnicas de citometría de flujo y de inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra dichas moléculas.

La comparación de los valores de la intensidad de expresión pretrasplante (día 0), determinados por su canal medio de expresión, con los valores postrasplante de dichas moléculas, permite determinar un índice del incremento o disminución. De esta manera, se comprueba que en el caso de buena evolución del injerto, las moléculas permanecen en niveles similares o inferiores a los del pretrasplante, mientras que durante los episodios de rechazo agudo superan los valores pretrasplante, pudiéndose detectar este incremento tan pronto como 6 a 3 días antes que la determinación anatomopatológica (Fig. 1).

En la figura 1, se representa la evolución de los canales de expresión medios de las moléculas CD28 sobre los linfocitos T CD4+ y las moléculas CD80 y CD86 sobre los linfocitos B CD19+ a lo largo de un mes de monitorización de receptores de trasplante hepático que no sufrieron episodios de rechazo agudo (cuadro superior), y de receptores con rechazo agudo (cuadro inferior).

Se utilizan muestras de sangre periférica anticoagulada con EDTA extraídas cada 3 días después del trasplante, marcadas con anticuerpos monoclonales específicos contra las moléculas CD28, CTLA-4, CD80 y CD86 por técnicas de triple inmunofluorescencia en la siguiente combinación CD80FITC- CD86PE-CD19PerCP, CD28FITC-CTLA-4PE-CD4PerCP, CD28FITC-CTLA-4PE-CD8PerCP y un tubo control de cada una de las fluorescencias (FITC 1ª-fluorescencia, PE 2ª-fluorescencia y PerCP 3ª-fluorescencia).

La preparación de la muestra requiere, añadir a 100 μ L de sangre periférica 10 μ L de cada anticuerpo monoclonal correspondiente e incubar 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad, lisando posteriormente los eritrocitos y lavando las células con PBS (Tampón fosfato salino).

El análisis citométrico debe estar estandarizado para garantizar la fiabilidad de la comparación de la intensidad de las fluorescencias de muestras analizadas en diferentes días. La estandarización se realiza mediante la medida directa de unos calibradores con valores de fluorescencia fijos, y en caso de algún cambio significativo, el citómetro debe ser recalibrado.

Una vez marcadas las muestras, 8.000 células de aspecto linfocitario son adquiridas en el citómetro mediante una ventana de adquisición realizada en FSC/SSC(Tamaño/Complejidad celular). Estas células, son analizadas mediante un programa de análisis adecuado para evaluar el número de células positivas para dichas moléculas respecto al control de fluorescencias, e igualmente útil para determinar el canal medio de expresión de las mismas sobre las células estudiadas, lo que nos da una estimación numérica de su intensidad de expresión.

La intensidad de expresión, estimada por el canal medio de fluorescencia, de las moléculas CD80 y CD86 se evalúa sobre monocitos y linfocitos B analizando el tubo con el marcaje CD80FITC-CD86PE-CD19PerCP, mientras que la de las moléculas CD28 y CTLA-4 se analizan sobre los linfocitos CD4+ analizando el tubo CD28FITC-CTLA-4PE-CD4PerCP y sobre los linfocitos CD8+ con el tubo CD28FITC-CTLA-4PE-CD8PerCP Comparando los valores obtenidos en cada día postrasplante, con los del análisis pretrasplante, se puede valorar la evolución postrasplante de dichas moléculas (Fig. 2)

La figura 2, es una representación inmunocitométrica de la expresión de la molécula CD28 sobre los linfocitos T CD4+ (en histogramas), y de las moléculas CD80 y CD86 sobre los linfocitos B CD19+ (en contornos de densidad), en

un receptor de trasplante hepático en el día del pretrasplante (columna izquierda) y en el día de la detección anatomopatológica de rechazo agudo (columna derecha).

Cuando estas moléculas se elevan conjuntamente por encima de sus valores pretrasplante se corresponde con la aparición de rechazo agudo. Debemos tener en cuenta, que el incremento en la expresión de las moléculas CD80 y CD86 muestran una alta especificidad (100%) y sensibilidad (82.5 %) en la predicción de rechazo agudo, apareciendo elevadas sólo durante los mismos, mientras que el CD28, de elevación máxima más precoz, a nivel individual puede incrementarse también por otras causas, resultando en un estimador menos específico, por lo que se requiere su análisis conjunto con CD80 y CD86, e incluso con CTLA-4, para garantizar su especificidad.

Como en todos los métodos analíticos, cada laboratorio debe estandarizar el método y establecer sus propios controles intra e interensayo que le permita establecer el índice de cambio para cada molécula relacionada con la aparición de rechazo agudo en los receptores de injertos. En nuestro grupo de estudio, los incrementos medios encontrados para dichas moléculas durante los episodios de rechazo agudo, considerando el valor pretrasplante como el 100 %, fueron CD28 135 $\pm$ 20, CD80 343 $\pm$ 87, CD86 480 $\pm$ 160 (Figura 3).

En la figura 3, se representan los cambios porcentuales medios de la intensidad de expresión de la molécula CD28 sobre linfocitos T CD4+ (en línea) y, de las moléculas CD80 y CD86 sobre los linfocitos B CD19+ (en barras, negras y rayadas respectivamente), durante los periodos pre y posttrasplante en los receptores de injertos hepáticos que presentaron episodios de rechazo agudo.

El método de análisis de la expresión de las moléculas CD28, CTLA-4, CD80 y CD86 que se describe, de la misma manera podría tener aplicación en el estudio de rechazo agudo de otros órganos (riñón, corazón, pulmón, páncreas, intestino y médula ósea).

REIVINDICACIONES

1. Método de análisis de rechazo agudo en el trasplante ortotópico de hígado **caracterizado** por la determinación de la intensidad de expresión de las moléculas coestimuladoras (CD28, CTLA-4, CD80 y CD86) en la superficie de linfocitos de sangre periférica por citometría de flujo, mediante el cual se puede detectar una disminución en la intensidad de expresión de las moléculas CD28, CTLA-4, CD80 y CD86 sobre los linfocitos de sangre periférica por técnicas de citometría de flujo en los trasplantados hepáticos sin episodios de rechazo agudo durante las 3 primeras semanas postrasplante, mientras que los receptores con episodios de rechazo agudo muestran un incremento en la expresión de dichas moléculas en el mismo periodo, coincidiendo además, con los episodios de rechazo agudo (Figura 1).

2. Método de análisis de rechazo agudo en el trasplante ortotópico de hígado según reivindicación 1, **caracterizado** por el uso de una combinación de los marcadores CD28, CTLA-4, CD80 y CD86 con los marcadores que diferencian a cada uno de los subgrupos de células de sangre periférica implicadas de modo importante en la

respuesta inmunitaria contra el injerto hepático (CD80FITC-CD86PE-CD19PerCP, CD28FITC-CTLA-4PE-CD4PerCP, CD28FITC-CTLA-4PE-CD8PerCP), y que permite detectar el incremento de expresión de dichas moléculas, de fundamental importancia en los procesos de activación celular que acompañan los episodios de rechazo agudo.

3. Método de análisis de rechazo agudo en el trasplante ortotópico de hígado según reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por permitir, igualmente, la evaluación de la eficacia del tratamiento antirechazo, ya que es capaz de detectar la disminución de la expresión que sufren en el receptor del injerto las moléculas mencionadas en las reivindicaciones 1 y 2, tras la instauración de la tratamiento antirechazo.

4. Método de análisis de rechazo agudo en el trasplante ortotópico de hígado según reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por ser también de aplicación para el estudio de otras moléculas coestimuladoras asociadas a la vía de activación linfocitana del CD28/CD80-CD86, tales como el CTLA-4, para la detección del rechazo agudo de aloinjertos.

FIGURA 1

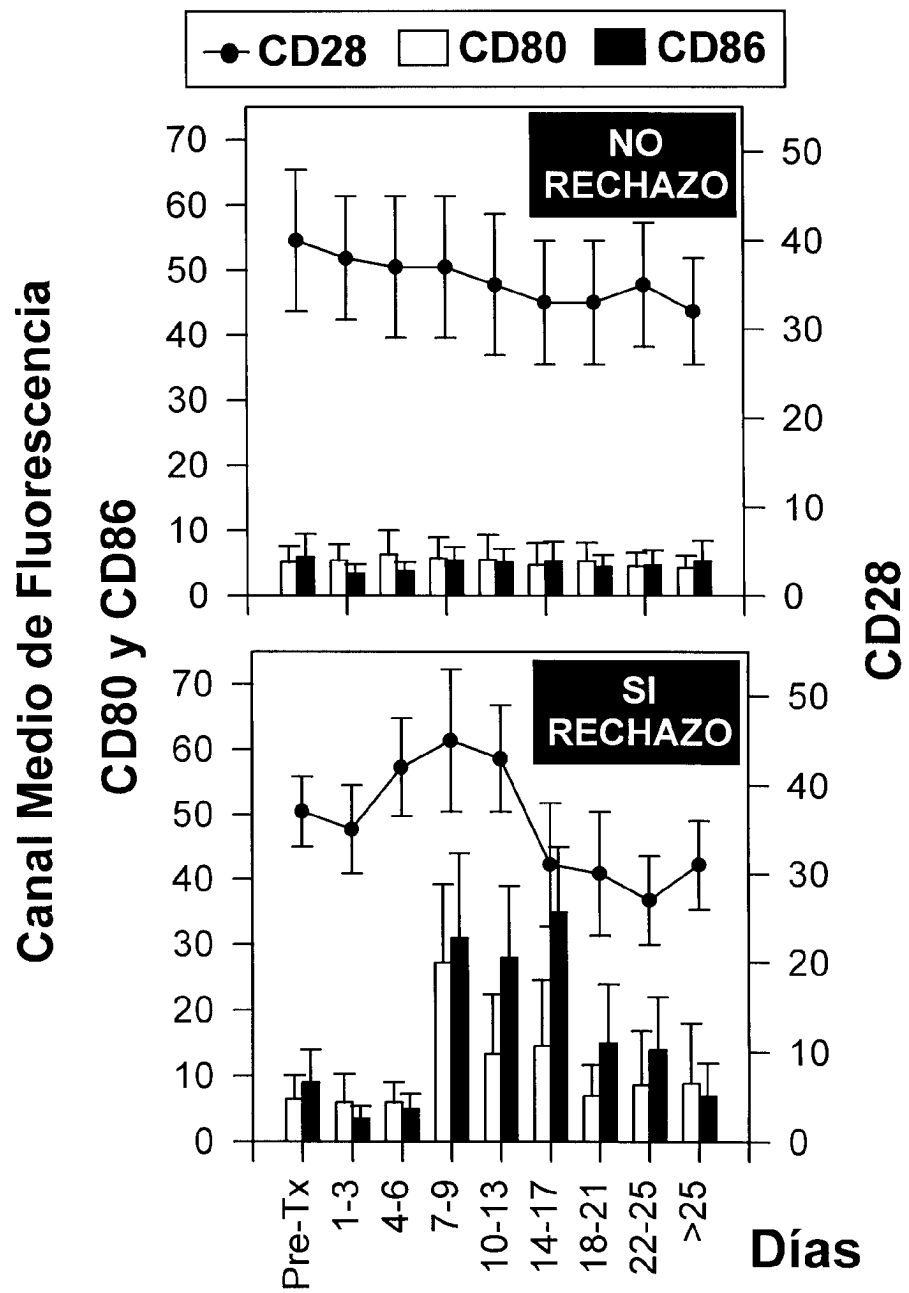


FIGURA 2

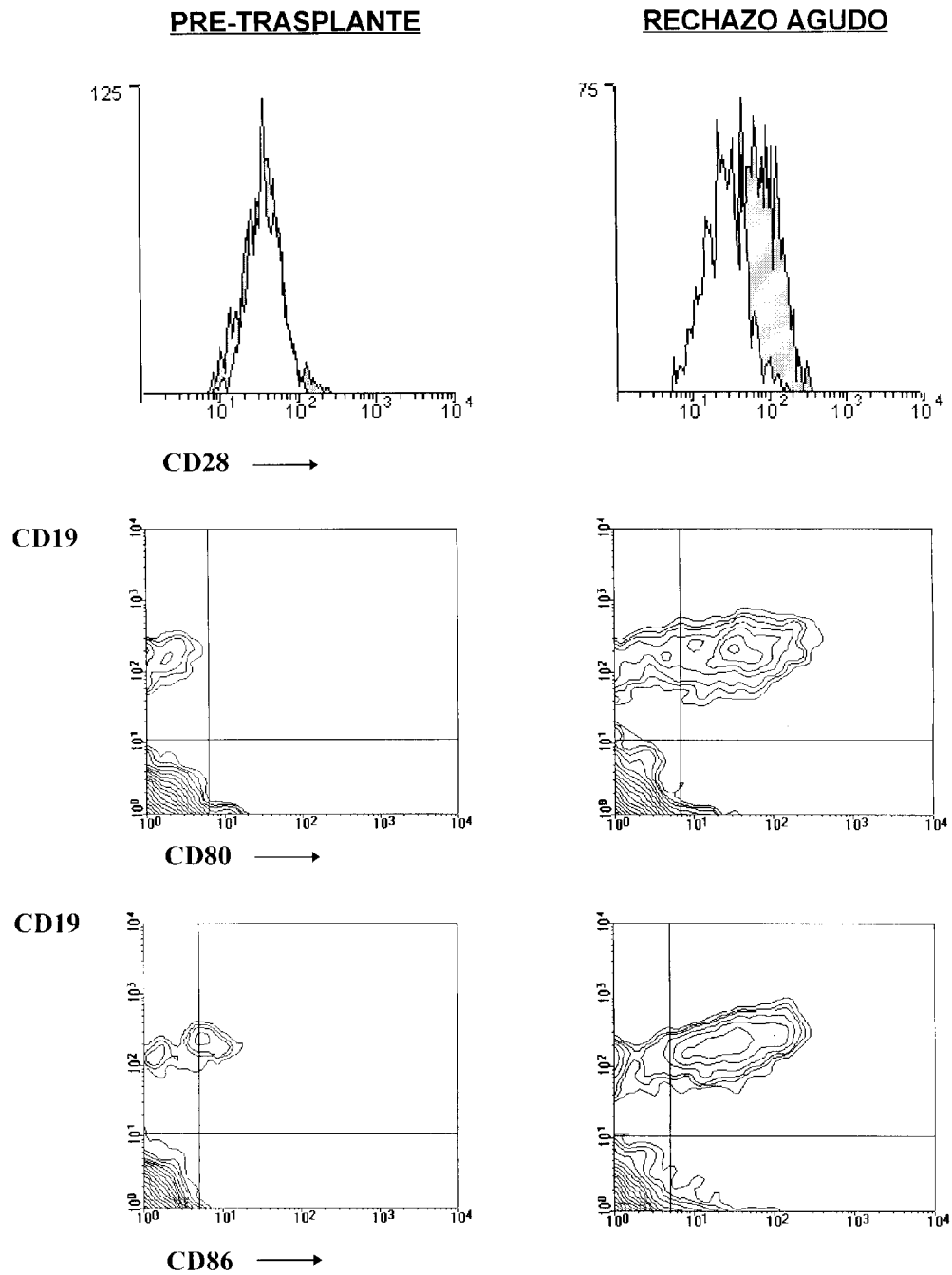
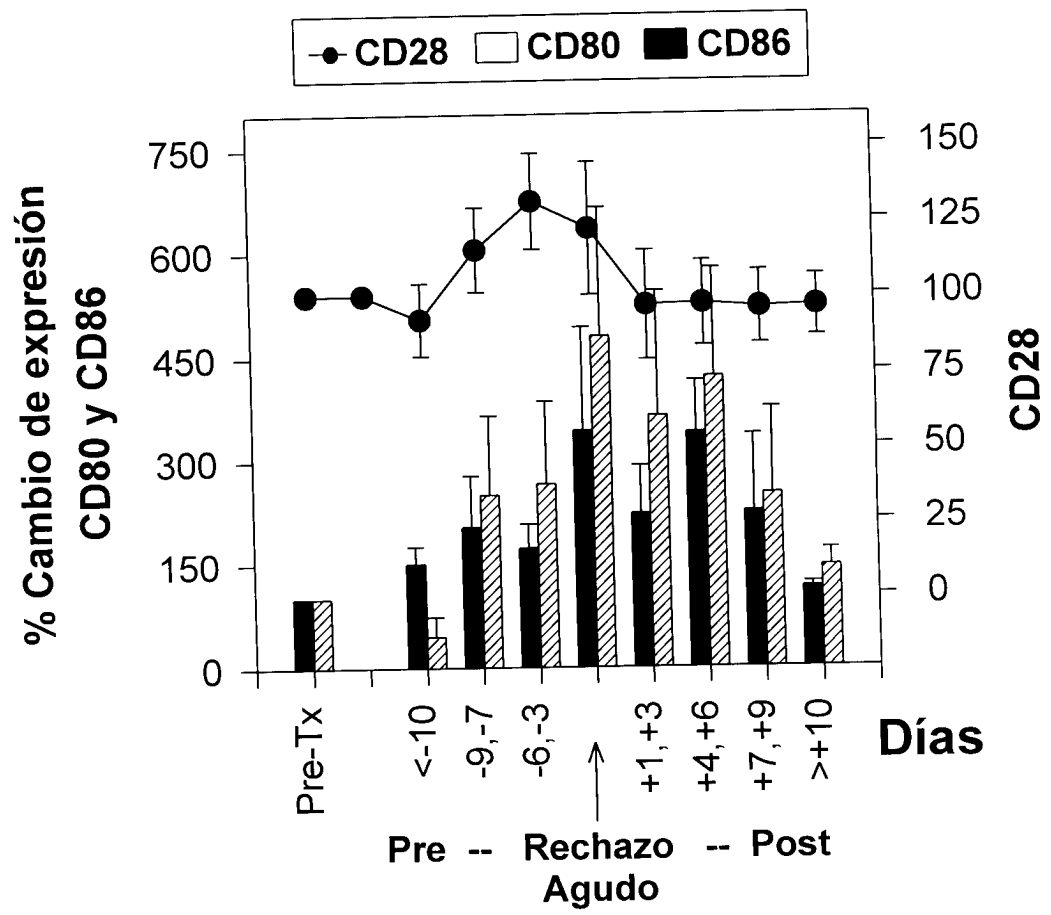


FIGURA 3





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 133 085
⑫ N.º solicitud: 9700050
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 30.12.96
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: G01N 33/564, 33/58, C07K 14/725

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9534320 A3 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA) 21.12.1995, página 2, línea 25 - página 7, línea 22.	1-4
A	WO 9428912 A1 (THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 22.12.1994, página 3, líneas 5-30.	1-4
A	WO 8705912 A1 (T CELL SCIENCES, INC) 08.10.1987, página 17, líneas 5-30; página 34, líneas 15-20; página 52, línea 20 - página 54, línea 3.	1-4
A	PAGE et al. "Human endothelial stimulation of allogeneic T cells via CTLA-4 independent pathway". 1994. TRANSPLANT IMMUNOLOGY, Vol. 2 (4), páginas 342-347.	1-4
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado ☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones n.º:		
Fecha de realización del informe 24.05.99	Examinador A. Collados Martín Posadillo	Página 1/1