

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 252**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03746717 .2**
96 Fecha de presentación: **11.04.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1495134**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2005**

54 Título: **Método para monitorizar la respuesta inmunitaria y predecir los desenlaces clínicos en receptores de trasplantes**

30 Prioridad:
11.04.2002 US 371402 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.04.2012

73 Titular/es:
CYCLEX, INC.
8980 OLD ANNAPOLIS ROAD, SUITE 1
COLUMBIA, MD 21045, US

72 Inventor/es:
BRITZ, Judith, A.;
SOTTONG, Peter, R. y
KOWALSKI, Richard, J.

74 Agente/Representante:
Zuazo Araluze, Alexander

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).

ES 2 379 252 T3

DESCRIPCION

Método para monitorizar la respuesta inmunitaria y predecir los desenlaces clínicos en receptores de trasplantes.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere generalmente a métodos para monitorizar la respuesta inmunitaria en un paciente que recibe fármacos inmunosupresores. En particular, la invención proporciona métodos basados en la medición de marcadores metabólicos de activación en células inmunitarias como indicador de la respuesta inmunitaria del paciente. Los métodos pueden usarse para predecir desenlaces clínicos y determinar ciclos de tratamiento para pacientes tales como receptores de trasplantes.

Antecedentes de la invención

Cada año, se estima que se realizan 55.000 trasplantes de órganos en todo el mundo.¹ En conjunto, se estima que el número de receptores de órganos vivos es actualmente de más de 300.000. La mayoría de estos receptores de trasplantes seguirán tomando fármacos inmunosupresores durante el resto de sus vidas para prevenir episodios de rechazo. Se requieren dosis controladas de estos fármacos para prevenir la sobremedicación, lo que puede dejar al paciente susceptible a enfermedad oportunista, riesgo aumentado de cáncer o enfermedad cardiovascular y efectos de toxicidad farmacológica, o subdosificación, lo que puede conducir a supervivencia del injerto acortada debido a episodios de rechazo.

Los dos fármacos principales usados en el mantenimiento del trasplante son actualmente ciclosporina (Novartis) y tacrolimús¹ (Fujisawa). Estos fármacos son inhibidores de calcineurina, una enzima clave implicada en la activación de células T.² Se realiza rutinariamente monitorización farmacoterapéutica (TDM) para estos dos fármacos inmunosupresores, tal como prescriben los fabricantes. Sin embargo, la cantidad del fármaco medida en la sangre no se correlaciona directamente con la dosis del fármaco administrado debido a las diferencias farmacocinéticas individuales.³ Además, el nivel de fármaco determinado mediante inmunoensayo no se correlaciona con la eficacia del fármaco inmunosupresor.⁴ Por tanto, el principal valor de estas pruebas de TDM es evitar niveles tóxicos y monitorizar el cumplimiento del paciente.

Actualmente no hay ningún método disponible para la evaluación directa del estado inmunitario en receptores de trasplantes.

35 **Sumario de la invención**

La invención objeto proporciona un método de monitorización de respuestas inmunitarias en un paciente que está evaluándose como receptor de órganos y/o está recibiendo al menos un fármaco inmunosupresor (véanse las reivindicaciones). Este método conveniente y fiable incluye las etapas de analizar las respuestas inmunológicas de un conjunto o subconjunto de linfocitos a partir de una muestra de sangre determinando al menos un nivel de actividad funcional y comparándolo con las respuestas inmunológicas de linfocitos con niveles definidos de respuestas inmunológicas humanas (bajas, moderadas o fuertes). Esta evaluación del estado inmunitario del paciente se basa en esta comparación. Las respuestas inmunitarias se establecen midiendo un componente intracelular que aumenta si las células han respondido a un estímulo.

En la invención, el paciente es un receptor de trasplante. Por ejemplo, el paciente puede ser un receptor de un trasplante de corazón, pulmones, riñón, páncreas, hígado, intestino delgado u otros órganos, tejidos o médula ósea. Puede administrarse al menos un fármaco inmunosupresor, por ejemplo, inhibidores de calcineurina, inhibidores enzimáticos, antimetabolitos, fármacos de reducción de linfocitos, corticosteroides u otros moduladores inmunitarios. También pueden administrarse combinaciones de fármacos. El efecto global de los fármacos sobre las respuestas inmunitarias puede medirse usando un ensayo que detecta aumentos en un componente intracelular, ATP, mediante estimulación con un mitógeno o antígeno y empleando entonces un ensayo de luciferasa.

Un aspecto de la invención es un método para predecir un desenlace clínico en un paciente de trasplante que está recibiendo ninguno o uno o más fármacos inmunosupresores. El método utiliza intervalos medidos de respuestas de linfocitos derivadas de una cohorte de individuos aparentemente sanos como medios de definición de intervalos normales de reactividades, e incluye las etapas de determinar al menos un valor de respuesta de linfocitos en una muestra de sangre de un paciente antes o después de la administración de fármaco(s) inmunosupresor(es); determinar si la respuesta de linfocitos de las células del paciente que recibe el fármaco inmunosupresor es superior o inferior al intervalo definido para individuos aparentemente sanos, o se encuentra dentro del mismo; y proporcionar una guía para la terapia y predecir desenlaces clínicos basándose en la comparación. Los estados o desenlaces clínicos que pueden predecirse incluyen rechazo de trasplantes, sobremedicación e infección. Por ejemplo, una respuesta de linfocitos que se encuentra en el intervalo bajo indica alta inmunosupresión y puede ser indicativa de sobremedicación que puede conducir a toxicidad orgánica, infección o, a largo plazo, cáncer. Una respuesta de linfocitos que se encuentra en el intervalo fuerte indica un estado poco inmunosuprimido, que puede ser indicativo de infección o un ciclo que conduce a rechazo del órgano. Alternativamente, una respuesta de linfocitos que se

encuentra en el intervalo moderado puede indicar que se ha logrado la estabilidad de la respuesta inmunológica y que no se justifican cambios en el régimen terapéutico en ese momento.

- 5 Otro aspecto de la invención es usar el ensayo para monitorizar pacientes que están retirándose gradualmente del/de los fármaco(s) inmunosupresor(es), o para medir el cumplimiento del paciente con las instrucciones de prescripción de la medicación.

10 También se describe un método (no reivindicado) para evaluar el impacto farmacodinámico (efecto fisiológico) de un fármaco inmunosupresor en un paciente sin trasplante. El método incluye las etapas de determinar un valor de una respuesta inmunitaria en al menos una muestra de linfocitos del paciente sin trasplante; comparar el valor con valores en un conjunto de referencia que comprende intervalos de valores de respuesta inmunológica para linfocitos; y evaluar el efecto farmacodinámico del fármaco inmunosupresor basándose en una comparación realizada en dicha etapa de comparación. El paciente sin trasplante puede estar recibiendo el fármaco inmunosupresor para un estado patológico tal como autoinmunidad, inflamación, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso o artritis reumatoide. El
15 método se llevará a cabo normalmente para reducir complicaciones de infecciones o cáncer en el paciente sin trasplante (no reivindicado).

Breve descripción de los dibujos

20 Figura 1: Ilustra esquemáticamente un ensayo de función de células inmunitarias tal como se expone en la patente estadounidense 5.773.232. Se estimulan linfocitos, se incuban y se separan células CD4+ mediante separación magnética; se lavan las células y se lisan para liberar ATP, que se detecta.

25 Figura 2: Distribuciones de respuestas inmunitarias de adultos aparentemente sanos, receptores de trasplantes y pacientes con VIH. Eje Y = ATP (ng/ml). Se indican las zonas de respuesta inmunitaria baja (≤ 225 ng/ml de ATP), moderada (>225 ng/ml de ATP y >525 ng/ml de ATP) y fuerte (≥ 525 ng/ml de ATP).

Figura 3: Comparación de respuestas inmunitarias funcionales en tres centros. Eje Y = ATP (ng/ml).

30 Figura 4: Comparación de la respuesta de la función de células inmunitarias Cylex™ en receptores de riñón, hígado y páncreas y páncreas y riñón simultáneos (SPK). Eje Y = ATP (ng/ml).

Figura 5. Respuesta inmunitaria frente a la monitorización farmacoterapéutica valle de tacrolímús. Eje X = concentración de tacrolímús (ng/ml); eje Y = ATP (ng/ml).
35

Figura 6. Intervalo de respuesta de células inmunitarias frente al tiempo desde el trasplante. El eje Y sigue el tiempo desde el trasplante; el eje X es el % de población.

40 Figura 7: Estudio de caso 1: rechazo asociado con la función de células inmunitarias a pesar del recuento de linfocitos reducido tras la terapia de inducción. Eje X = tiempo (días); eje Y izquierdo, respuesta inmunitaria (ATP ng/ml); eje Y derecho = número de linfocitos.

Figura 8: Estudio de caso 2. Duración de la terapia de rescate mediante la medición de la función inmunitaria. Eje X = tiempo en semanas; eje Y = respuesta inmunitaria (ATP ng/ml).
45

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención.

La presente invención proporciona métodos de determinación y/o monitorización del estado del sistema inmunitario de un individuo. Los métodos implican la medición del nivel de marcadores metabólicos de activación celular en un subconjunto de células inmunitarias como medición de la respuesta inmunitaria, y la asignación de la respuesta
50 inmunitaria a una zona o intervalo normalizado de reactividad inmunitaria. La práctica del método proporciona así un único punto de tiempo, "instantánea", de la respuesta inmunitaria del individuo. Alternativamente, monitorizando la respuesta inmunitaria de un individuo a varios puntos de tiempo, es posible obtener una imagen completa de la reactividad del sistema inmunitario a lo largo del tiempo. Los métodos de la presente invención hacen posible
55 observar, por ejemplo, la respuesta del sistema inmunitario de un paciente a un procedimiento médico y ajustar los protocolos de tratamiento en consecuencia. Además, los inventores han descubierto que, usando los métodos de la presente invención, es posible predecir ciertos desenlaces clínicos relacionados con el funcionamiento del sistema inmunitario. Por ejemplo, en una realización preferida de la invención, un paciente cuyo sistema inmunitario se monitoriza puede seguir un régimen de terapia con fármaco inmunosupresor. En algunas reivindicaciones, el/los
60 fármaco(s) inmunosupresor(es) se administra(n) como resultado de un trasplante de órganos. Monitorizando la respuesta inmunitaria de un paciente de este tipo, es posible predecir el riesgo de rechazo del órgano trasplantado; o establecer si el paciente está sobremedicado, un estado que puede contribuir a un aumento del riesgo de infección oportunista, toxicidad orgánica o complicación cardiovascular.

65 El marcador metabólico de activación celular que puede medirse en la práctica de la presente invención es adenosina trifosfato (ATP). Los ejemplos de subconjuntos de células inmunitarias en las que puede medirse un

marcador metabólico incluyen pero no se limitan a subconjuntos de linfocitos tales como células CD4, CD3, CD19 y CD56.

En una realización de la presente invención, el estado del sistema inmunitario se establece midiendo el nivel de ATP presente en células CD4. Con el fin de realizar una medición de ATP, se obtiene una muestra de sangre completa del paciente. Se derivan ciertas ventajas del uso de sangre completa en la incubación. Por ejemplo, los fármacos inmunosupresores y las células presentadoras de antígeno requeridas para la activación celular se conservan en la muestra, las células se mantienen en su propio plasma y se elimina una etapa de prepurificación inicial. La muestra de sangre completa se incuba con al menos un estimulante, fitohemaglutinina (PMA). Tras un tiempo de incubación suficiente, se retiran las células CD4 de la muestra (es decir, se aíslan). En general, el tiempo para la incubación de la muestra de sangre completa y el mitógeno está en el intervalo de horas a días, y preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,5-6 a aproximadamente 24-48 horas. Entonces se retiran las células CD4, por ejemplo, usando partículas paramagnéticas que contienen un anticuerpo específico para células CD4. Sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que la retirada de las células CD4 puede llevarse a cabo mediante una variedad de medios que se conocen bien, tales como separaciones en columna, cribado o usando partículas ferrosas o de plástico con ligandos para la unión de células inmunitarias.

Entonces se lisan las células CD4 aisladas, y se cuantifica el nivel de ATP en el lisado. Se conocen bien en la técnica métodos de lisis. La detección de ATP puede lograrse mediante cualquiera de varios métodos adecuados, tales como análisis enzimático, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o cromatografía en capa fina (CCF). Sin embargo, en una realización preferida, el ATP se detecta mediante un ensayo de luciferina-luciferasa. Una alternativa es que las células no se lisan, y el producto de activación se mide dentro de la célula mediante citometría, colorimétricamente o mediante un indicador quimioluminiscente.

Los inventores han descubierto que la respuesta inmunitaria de un individuo a cualquier punto de tiempo puede clasificarse según la cantidad de un marcador metabólico de activación en células inmunitarias que se detecta. Por ejemplo, un nivel de ATP que se detecta en un paciente puede cuantificarse frente a niveles patrón conocidos de ATP detectados en individuos aparentemente sanos y generados usando una curva de calibración. La invención también proporciona por tanto un sistema para clasificar una respuesta inmunitaria como baja, moderada o fuerte; o alternativamente, para asignar una respuesta inmunitaria a una zona o intervalo bajo, moderado o fuerte de reactividad. En una realización del sistema de clasificación de la presente invención, el ATP es el marcador metabólico, y una respuesta inmunitaria es baja si el nivel de ATP detectado es de 225 ng/ml o menos, moderada si el nivel es superior a 225 ng de ATP/ml pero inferior a 525 ng de ATP/ml, y fuerte si el nivel es de 525 ng de ATP/ml o superior. Por tanto, la respuesta inmunitaria de un individuo puede clasificarse como baja, moderada o fuerte basándose en el nivel de marcador metabólico (por ejemplo ATP) que se detecta.

Además de obtener una medición de la respuesta del sistema inmunitario de un individuo a un único punto de tiempo, frecuentemente puede ser útil comparar los niveles de marcador metabólico obtenidos a varios puntos de tiempo, por ejemplo, con el fin de monitorizar el impacto de un ciclo de acontecimientos sobre el sistema inmunitario de un individuo. Por ejemplo, pueden monitorizarse los niveles de ATP antes, durante y después de la terapia farmacológica, o antes y después de realizarse la cirugía de trasplante de órganos, con el fin de monitorizar cambios a lo largo del tiempo en la respuesta inmunitaria del paciente en respuesta a estos procedimientos médicos. Esta información referente al estado inmunitario del paciente puede ser un complemento a la monitorización farmacoterapéutica a cualquier punto en el ciclo de terapia con el fin de evaluar la evolución de un paciente, la idoneidad de un régimen farmacológico y para predecir los desenlaces clínicos para un paciente (véase a continuación).

La presente invención proporciona métodos de determinación y monitorización del estado del sistema inmunitario de un paciente en respuesta a un estímulo tal como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el paciente es uno que está recibiendo o que recibirá un fármaco o fármacos inmunomoduladores. Por ejemplo, el paciente puede ser el receptor de un órgano tal como corazón, pulmones, riñón, páncreas, hígado, intestino, piel, médula ósea u otros órganos. Además, un paciente de trasplante puede ser el receptor de más de un órgano, por ejemplo un receptor de trasplante de "corazón-pulmón". Alternativamente, el trasplante puede ser tejido trasplantado. El tejido u órgano(s) trasplantado(s) puede(n) ser de cualquier fuente conocida por los expertos en la técnica, por ejemplo, de un donante de órganos vivo tal como un familiar (por ejemplo, un hermano/a) o un donante no emparentado compatible; de un cadáver; o de un tejido u "órgano" artificial que se ha desarrollado y/o mantenido en un entorno de laboratorio, por ejemplo tejido u "órganos" hechos crecer a partir de células madre, o cultivados en un entorno de laboratorio a partir de muestra de tejido o células.

Los expertos en la técnica reconocerán que existen muchos tipos de fármacos inmunosupresores que pueden administrarse, cuyos efectos sobre el sistema inmunitario de un paciente pueden monitorizarse mediante los métodos de la presente invención. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a fármacos anti-linfocitos tales como OKT3, gammaglobulina anti-timocitos (ATGAM), Daclizumab y Basiliximab (anti-IL2R); inhibidores de calcineurina tales como tacrolímús (Prograf®, FK506) o ciclosporina (Neoral®); antimetabolitos tales como azatioprina, ciclofosfamida, y micofenolato mofetil; inhibidores enzimáticos tales como sirolímús (Rapamune), o corticocorticoides tales como prednisona, o metilprednisolona (Solumedrol).

La presente invención proporciona un método de guía de decisiones referentes a terapias y de predicción del desenlace clínico de un paciente que recibe uno o más fármacos inmunosupresores. Desenlaces clínicos posibles son rechazo del órgano trasplantado. Con el fin de predecir desenlaces clínicos tales como estos, es ventajoso determinar un nivel inicial de la respuesta inmunitaria tan temprano en el ciclo de fármaco inmunosupresor como sea posible con el fin de iniciar la vigilancia del estado inmunitario del paciente coincidente con o poco después de la cirugía de trasplante, aunque la monitorización puede comenzar en cualquier punto tras la administración de los fármacos inmunomoduladores. Las respuestas inmunitarias posteriores se evalúan y se comparan con la respuesta anterior, y entre sí. Cualquier valor de respuesta inmunitaria dada (ATP ng/ml) puede asignarse a una categoría de un intervalo conocido de valores, y una comparación de los cambios en los valores medidos a lo largo del tiempo permite la observación de tendencias en la respuesta inmunitaria del paciente. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria del paciente a cualquier punto en el tiempo puede clasificarse como baja (ATP ng/ml ≤ 225), moderada (ATP ng/ml > 225 y < 525), o fuerte (ATP ng/ml ≥ 525), y puede observarse una tendencia hacia una respuesta inmunitaria aumentada o disminuida.

En una realización preferida, se obtiene una muestra de sangre inicial y se somete a prueba antes de la cirugía de trasplante de órganos y antes de que se administre cualquier fármaco inmunosupresor. Se establece el valor de la respuesta inmunitaria y se compara con las categorías de intervalos de valores conocidos (por ejemplo, baja, moderada o fuerte). Basándose en estos valores, la dosis de fármaco inicial puede mantenerse dentro o modificarse con respecto a la práctica habitual de asignación de dosis basándose en el peso corporal del paciente. Por ejemplo, a un candidato a trasplante que se determina que está inmunosuprimido debido a una enfermedad infecciosa (por ejemplo SIDA) puede administrársele una dosis de fármaco inferior o inexistente, en comparación con otro individuo del mismo peso corporal.

En otra realización preferida, se obtiene una muestra de sangre inicial y se somete a prueba antes de la cirugía de trasplante de órganos y antes de que se administre cualquier fármaco inmunosupresor, y se somete a prueba otra muestra de sangre después de la cirugía y después de la administración de fármacos. Comparando los valores obtenidos a partir de estas muestras, pueden emitirse juicios médicos en relación con el efecto de la cirugía y los fármacos sobre el paciente con referencia específicamente al estado inmunitario. Por ejemplo, si el valor obtenido a partir de la muestra obtenida posteriormente a la primera estaba en un intervalo inferior a la primera, pueden indicarse pruebas adicionales y/o reducirse las dosis de medicación para evitar la posibilidad de sobremedicación. Si el valor obtenido a partir de la muestra obtenida posteriormente a la primera estaba en un intervalo superior a la primera, pueden indicarse pruebas adicionales y/o aumentarse las dosis de medicación para evitar la posibilidad de rechazo del órgano.

En otra realización preferida, una muestra de sangre obtenida y sometida a prueba a cualquier punto tras la cirugía puede proporcionar información sobre el estado inmunitario referente al nivel de supresión inmunitaria cuando se comparan los niveles con categorías de intervalos de valores conocidos. Por ejemplo, si el valor obtenido está en el intervalo débil, pueden indicarse pruebas adicionales y/o reducirse las dosis de medicación para evitar la posibilidad de sobremedicación. Si el valor obtenido está en el intervalo fuerte, pueden indicarse pruebas adicionales y/o aumentarse las dosis de medicación, o iniciarse una terapia de rescate para evitar la posibilidad de rechazo de órganos. Además, si el valor está en el intervalo moderado, y particularmente si el valor no fluctúa significativamente (por ejemplo permanece dentro de la misma zona) durante al menos dos mediciones mensuales consecutivas, esto puede indicar que se ha logrado la estabilidad de la respuesta inmunitaria, y que no son necesarios en ese momento ajustes en el régimen de tratamiento.

Con respecto a la frecuencia a la que se analizan muestras de sangre, los expertos en la técnica reconocerán que la toma de muestras puede realizarse a cualquier punto al que un experto (por ejemplo un médico) lo considera aconsejable. En general, tales pruebas se llevarían a cabo como máximo diariamente (por ejemplo durante un tiempo en el que un paciente corre el máximo riesgo) y al menos mensualmente (por ejemplo durante un tiempo en el que un paciente parece estar relativamente estable).

Aún en otra realización preferida, se obtienen múltiples muestras de sangre y se someten a prueba a múltiples puntos tras la cirugía de trasplante de órganos y durante el periodo en el que están administrándose fármacos inmunomoduladores. Un ejemplo del valor predictivo de los métodos sería la detección, utilizando los métodos de la presente invención, de un aumento en la respuesta inmunitaria del paciente desde el intervalo bajo a moderado hasta el fuerte a lo largo de un periodo de tiempo. Los resultados pueden ser predictivos del posible rechazo agudo del órgano trasplantado, y pueden justificar, por ejemplo: el inicio de otras pruebas confirmatorias (por ejemplo biopsia de órganos o análisis de química sanguínea específico de órganos); un aumento en la dosis del fármaco que está administrándose, una terapia de rescate con un fármaco alternativo; o una nueva combinación de fármacos. En general, con el fin de predecir el posible rechazo de órganos, el estado de la respuesta inmunitaria debe monitorizarse durante varios días, y preferiblemente durante aproximadamente 3-5 días. En el caso de la monitorización de ATP, con el fin de concluir que existe un riesgo de rechazo del órgano, la respuesta inmunitaria del paciente debe mostrar un aumento en el intervalo de al menos aproximadamente 50 ng/ml de ATP a 100 ng/ml de ATP.

Por otro lado, una disminución inesperada en la respuesta inmunitaria a lo largo de un periodo de tiempo puede ser

predictiva del riesgo de desarrollar una infección oportunista debido a sobremedicación. Por ejemplo, si la respuesta inmunitaria de un paciente disminuye del intervalo moderado al intervalo bajo, esto puede ser indicativo de sobremedicación y justificar el inicio de pruebas confirmatorias adicionales (por ejemplo biopsia de órganos o análisis de la función orgánica, o ensayos para organismos infecciosos mediante PCR), o una reducción o un cambio en la medicación. En general, con el fin de detectar posible sobremedicación, el estado de la respuesta inmunitaria debe monitorizarse durante varios días, y preferiblemente durante aproximadamente 3-5 días. Con el fin de concluir que existe un riesgo de sobremedicación, la respuesta inmunitaria del paciente debe mostrar una disminución en el intervalo de al menos aproximadamente 50 ng/ml a 100 ng/ml de ATP.

El método puede ser útil además para monitorizar la respuesta inmunitaria de un paciente durante la fase de la terapia inmunosupresora convencional de "retirada gradual" del paciente del fármaco, es decir, la fase durante la cual se disminuye la dosificación del fármaco del paciente tanto como sea posible para reducir el riesgo de toxicidad, mientras que se mantiene una baja posibilidad de rechazo del trasplante. En particular, este ensayo es especialmente valioso para monitorizar los protocolos de tolerancia cuando el objetivo es la eliminación final de todos los fármacos inmunosupresores. Por ejemplo, las dosis de fármacos pueden reducirse en un paciente cuyo nivel de fármaco en sangre de FK506 (tacrolímús) es superior a 15 mg/ml, hasta 6-10mg de FK506 por kg de peso corporal 2-3 veces a la semana hasta que se logra el nivel de respuesta inmunitaria deseada. De manera similar, el método también puede usarse para evaluar el cumplimiento del paciente con los regímenes de medicación prescritos.

El método también es valioso en la monitorización del estado funcional de las respuestas inmunitarias de receptores de órganos a largo plazo, que han seguido las mismas dosificaciones de medicación durante periodos de tiempo prolongados (años). Se ha mostrado que los pacientes que han tomado fármacos inmunosupresores a lo largo de un periodo prolongado padecen sobresupresión simultánea con ciclos farmacológicos prolongados.

Los métodos de la presente invención pueden usarse solos como medios primarios de seguimiento de la evolución de un paciente. Más frecuentemente, los métodos se usarán conjuntamente con y como complemento a otros medios de evaluación de la evolución de un paciente, por ejemplo, monitorización de los niveles de fármaco en la sangre, biopsia de órganos, pruebas de química orgánica específicas de órganos y similares.

Ejemplos

Materiales y métodos

Diseño del estudio.

Se realizó un estudio multicéntrico con una cohorte de 155 adultos aparentemente sanos y 127 receptores de trasplante de órganos. Los criterios de inclusión para adultos sanos, candidatos a donantes vivos y voluntarios consistían en hombres y mujeres de entre las edades de 19 y 64 años que eran elegibles para donar sangre según las directrices de donación de sangre establecidas. Los criterios de inclusión para receptores de trasplantes consistían en hombres y mujeres con edades de 19 a 64 que eran receptores de órganos de páncreas, hígado o riñón de cadáveres, de donantes emparentados vivos o de donantes no emparentados vivos. Se excluyeron del ensayo pacientes de trasplante si estaban infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana o si habían transcurrido más de cinco (5) años desde su trasplante.

La población adulta aparentemente sana que eran donantes de sangre consistían en un 24% (37) de mujeres, un 68% (105) de hombres y un 8% (13) no designado, con un intervalo de edad de 20-60 años. El origen étnico de la población era un 59% (91) de afroamericanos, un 28% (44) de raza blanca y un 13% (20) de otros. La población con trasplante consistía en un 43% (55) de mujeres y un 57% (72) de hombres, con un intervalo de edad de 20 - 64 años. El origen étnico de la población era un 24% (31) de afroamericanos, un 69% (87) de raza blanca y un 7% (9) de otros. Los órganos trasplantados eran un 59% (75) riñón, un 34% (43) hígado, un 2% (3) páncreas y un 5% (6) órganos múltiples (riñón y páncreas simultáneo).

Historia de los pacientes.

La historia de los pacientes de trasplante incluía el estado que predisponía al paciente para el trasplante, órgano(s) trasplantado(s) y su fuente (cadáver o donante emparentado o no emparentado vivo), tipo de terapia inmunosupresora, tiempo relativo hasta el trasplante, dosificación y niveles en sangre de fármacos inmunosupresores en el momento de la recogida de muestras, el género y la edad.

Protocolos de terapia.

Los tipos de terapias inmunosupresoras no estaban limitados durante este estudio. Se siguió el protocolo de referencia en cada centro para pacientes de trasplante en el alta hospitalaria y durante las visitas ambulatorias de mantenimiento. Los tipos de terapia incluían: terapia de inducción con OKT3 o ATG; inhibidores de calcineurina incluyendo tacrolímús (Prograf®) o ciclosporina-A (Neoral®); esteroides (prednisolona); y micofenolato mofetil

(MMF) Cellcept®. El uso y la dosificación se basaban en la práctica convencional en cada centro y variaban tanto dentro como entre los centros.

Recogida de muestras.

Se extrajeron dos muestras de sangre completa (una cada vez, tubos Vacutainer® anticoagulados con EDTA y heparina sódica) (B-D, Franklin Lakes, NJ) de adultos aparentemente sanos y pacientes de trasplante. Se usaron las muestras recogidas en tubos Vacutainer con heparina sódica (tapones verdes) para el ensayo de función de células inmunitarias Cylex™ ImmuKnow™ y se usaron las muestras recogidas en tubos Vacutainer con EDTA (tapones de color azul lavanda) para la citometría de flujo. Se manipularon las muestras y se sometieron a prueba según el prospecto de cada fabricante.

Ensayo de función de células inmunitarias Cylex™⁵ (ImmuKnow™)

Se sometió a prueba sangre completa (100 µl de una dilución 1:4) por cuadruplicado con o sin fitohemaglutinina (PHA) (2,5 µg/ml) durante la noche (15-18 horas en un incubador de CO₂ a 37°C). Se añadieron partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-CD4 humano (Dynal Biotech A.S.A., Oslo, Noruega) para inmunoseleccionar células CD4 a partir de los pocillos estimulados como no estimulados. Tras lavar las células CD4 seleccionadas sobre un imán fuerte (cat. de Cylex™ 1050), se añadió un reactivo de lisado para liberar el ATP intracelular. Entonces se añadió una mezcla de luciferina/luciferasa al lisado celular. En el plazo de 30 minutos tras la adición de la enzima, se midió el producto bioluminiscente en un luminómetro (PHL Mediators, Austria o Berthold, Maryville, TN, o Turner Designs, Sunnyvale, CA) (véase la figura 1). Se comparó la cantidad de luz emitida (máxima de emisión 562 nm) con una curva patrón generada con calibradores de ATP (0, 1, 10, 100, 1000 ng/ml). Entonces se calculó la concentración de ATP (ng/ml) en cada muestra a partir de la curva de calibración usando un programa basado en Excel proporcionado por Cylex™.

Monitorización farmacoterapéutica

Se midieron los niveles valle de tacrolímús en sangre completa usando un inmunoensayo enzimático (MEIA) en el sistema de inmunoensayo IMx según las instrucciones del fabricante (Abbott Diagnostics, North Chicago, IL).

Análisis estadístico

Se analizaron los resultados del ensayo de función de células inmunitarias Cylex™ ImmuKnow™ a partir de adultos aparentemente sanos y pacientes de trasplante mediante ANOVA o pruebas de la t de dos colas⁶ para evaluar la significación estadística de las diferencias. Se usó un gráfico de probabilidad doble (análisis ROC modificado) para establecer tres zonas de reactividad inmunitaria en las dos poblaciones⁷.

Ejemplo 1. Ensayo de función de células inmunitarias Cylex™ (ImmuKnow™): Principio del ensayo

El manejo satisfactorio del receptor de trasplante requiere actualmente inmunosupresión durante toda la vida del paciente para evitar el rechazo del injerto¹³. Aunque los inhibidores de calcineurina han mejorado drásticamente la supervivencia del injerto, el paciente corre un riesgo aumentado de toxicidad farmacológica, infecciones oportunistas y cáncer¹⁴. El manejo de intervalos terapéuticos relativamente estrechos de estos fármacos sigue siendo uno de los desafíos de la medicina de trasplantes. Aunque se realizan rutinariamente pruebas para los niveles valle de los principales fármacos de trasplantes para monitorizar los pacientes, su valor principal es evitar la toxicidad y evaluar el cumplimiento del paciente¹⁵. Antes de la presente invención, no existía ninguna prueba que midiese directamente la bioactividad de estos fármacos en el paciente a cualquier punto en el tiempo. Los métodos de la presente invención se diseñaron específicamente para evaluar la respuesta inmunitaria en pacientes que recibían fármacos inmunosupresores.

Los requisitos de terapia inmunosupresora para pacientes que se someten a trasplante son una función de un gran número de variables, incluyendo la enfermedad subyacente que condujo al trasplante, el grado de correspondencia de histocompatibilidad y la sensibilización antes del trasplante, el tipo de órgano, así como la capacidad del paciente individual para metabolizar el fármaco. Una vez que se realiza el trasplante y se inicia la terapia, el traumatismo de la cirugía, la anestesia y posiblemente las transfusiones de sangre supondrán un impacto colectivo sobre el estado de inmunosupresión neto del paciente.¹⁶ Ninguna prueba realizada en la actualidad permite la evaluación del estado inmunitario del paciente o bien antes de la cirugía o bien durante el periodo tras el trasplante, que es en promedio actualmente de 10 años. Esta aplicación describe los resultados de un ensayo multicéntrico que se diseñó para establecer estadísticamente intervalos de reactividad inmunitaria en receptores de trasplantes de órganos sólidos usando un ensayo para la medición de la inmunidad mediada por células T usando el ensayo de función de células inmunitarias Cylex™ (ImmuKnow™), que se representa en la figura 1.

En ensayo Cylex™ usa una muestra de sangre completa que se estimula con el mitógeno vegetal fitohemaglutinina (PHA). Se eligió deliberadamente la sangre completa como la muestra para mantener los linfocitos en presencia de

los fármacos inmunosupresores, que se reparten entre los glóbulos rojos y el plasma¹⁷. Además, aunque se evita la etapa de prepurificación, las células se mantienen también en su propio plasma, evitando la estimulación adicional de suero foráneo que se requeriría para incubar células purificadas. La fitohemaglutinina era el estímulo de elección porque los pacientes de trasplante pueden ser anérgicos y no se espera que respondan a estímulos más débiles incluyendo antígenos de recuerdo o aloantígenos. Además, puesto que la ciclosporina y el tacrolímus se diseñaron para inhibir la actividad total de células T, un mitógeno de amplio espectro (como PHA) es lo más apropiado. Entre los mitógenos, PHA es más potente que concanavalina A, o mitógeno de fitolaca americana. Por tanto, en pacientes altamente suprimidos, podría esperarse todavía alguna respuesta "intercurrente".

Tradicionalmente, se ha usado la linfoproliferación (LPA) como modelo *in vitro* para la inmunidad mediada por células¹⁸. En adultos sanos que se someten a vacunación con tétanos, el ensayo Cylex™ dio resultados comparables a la linfoproliferación¹⁰. Las curvas de dosis-respuesta de la respuesta de PHA, que comparan una adaptación de sangre completa de LPA, mostraron mayor sensibilidad del ensayo Cylex™ a dosis inferiores de PHA con respuestas medibles a las 24 horas frente a 3 días para LPA¹⁰.

LPA tiene varias desventajas porque requiere de 3 a 7 días para realizarse y usa timidina tritiada radiactiva¹⁸. Quizá de manera más importante, se purifican monocitos de sangre periférica de la sangre antes del cultivo, eliminando de ese modo los glóbulos rojos en los que se secuestran los inhibidores de calcineurina principales. Zeavi¹⁷ demostró recientemente que las respuestas de recuerdo, la alorreactividad y la activación inducida por PHA también se suprimían en el ensayo de ATP de sangre completa mientras que la proliferación en PBMC aisladas era todavía medible en receptores de trasplante que recibían terapia inmunosupresora. Una posible explicación es que la eliminación de glóbulos rojos y el tiempo de incubación prolongado (3-7 días) de LPA permitían la recuperación de células de la inmunosupresión, lo que no puede producirse en el modelo fisiológico humano. Otros han demostrado desde entonces (26) que los glóbulos rojos de pacientes de trasplante añadidos de nuevo a cultivos de LPA pueden restaurar la actividad inmunosupresora *in vitro*.

Tras la incubación durante la noche de sangre con PHA, se seleccionan células CD4 usando partículas paramagnéticas (Dynal) recubiertas con un anticuerpo monoclonal frente al epítipo CD4. Se seleccionan como diana células CD4 positivas que montan las respuestas inmunitarias tanto celular como humoral puesto que los fármacos inmunosupresores principales se diseñaron para inhibir específicamente la activación de células T que participaban en el rechazo. Tanto la ciclosporina como el tacrolímus inhiben la activación de células T reduciendo la transcripción de IL-2.

La mayoría de las funciones de células inmunitarias dependen directa o indirectamente de la producción de ATP⁸. Weir (patente estadounidense 5.773.232) patentó originalmente el uso de ATP como marcador de la activación de linfocitos⁵.

Cuando se evalúa el estado inmunitario de pacientes de trasplante que toman ciclosporina o tacrolímus, el ATP celular es una diana apropiada porque ambos compuestos inhiben la respiración mitocondrial, que es una fuente principal de ATP intracelular^{20,21}.

Por tanto, la reducción de la producción de ATP inhibe directamente la cascada de etapas requeridas para la funcionalidad de linfocitos incluyendo la transcripción de ARNm de citocinas, la producción de citocinas y en última instancia la proliferación de linfocitos, que depende también en gran medida de las citocinas. En una comparación directa de la cinética de producción de ATP producción y citocinas, el ATP precedía a la aparición de la mayoría de citocinas medidas.

Generalmente, los receptores de trasplantes que reciben terapia inmunosupresora son débilmente sensibles o no sensibles a pruebas cutáneas y muestran respuestas de citocinas inhibidas *in vitro*⁴ (Ahmed *et al.*). El ensayo de función de células inmunitarias Cylex™ (ImmuKnow™) usa la lecitina vegetal fitohemaglutinina (PHA) para estimular la activación de linfocitos⁵. Puesto que la mayoría de las funciones efectoras de células inmunitarias dependen del suministro de energía celular⁸, se diseñó el ensayo para medir aumentos en el ATP intracelular tras la activación mediante estimulación mitogénica, con antígenos de recuerdo o alogénica^{9,10,11}. Dado que la diana de los fármacos inmunosupresores principales, ciclosporina y tacrolímus, es la función de células T, se seleccionaron las células CD4 para la medición. Tanto ciclosporina como tacrolímus son fármacos lipófilos que se reparten en las membranas de glóbulos rojos. El ensayo usa una muestra de sangre completa para mantener la presencia del fármaco durante la incubación. El uso de sangre completa no sólo evita la necesidad de prepurificación de linfocitos sino que también mantiene un entorno para la presentación de antígenos eficaz. Usando sangre completa, el propio plasma del paciente está presente durante la incubación durante la noche, en vez de suero foráneo (AB humano o ternero fetal) que podrían proporcionar estimulación exógena¹¹. Pueden usarse muestras de pacientes hasta 30 horas tras la recogida. Puesto que las incubaciones son durante la noche, pueden realizarse en lotes las pruebas al final de cada día.

Se facilita una representación esquemática del ensayo en la figura 1. Se usó el ensayo para obtener los resultados presentados en los ejemplos 2-12.

Ejemplo 2. Caracterización estadística de los niveles de respuesta inmunitaria de adultos sanos y poblaciones

inmunosuprimidas

Se realizó un estudio basado en la población que comparaba las características de respuesta inmunitaria de controles adultos aparentemente sanos y receptores de trasplantes de órganos sólidos. Tal como se muestra en la figura 2, la población control aparentemente sana (n=155) dio una respuesta de estimulación en promedio de 432 ng/ml de ATP. Las características de respuesta inmunitaria de receptores de trasplantes (n=127) eran significativamente inferiores estadísticamente ($P < 0,0001$) que controles sanos en más de 150 ng de ATP, y promediaban 282 ng/ml de ATP. La comparación estadística de las dos poblaciones usando un gráfico de probabilidad doble modificado permitió la descripción de tres zonas de reactividad. El noventa y dos por ciento (92%) de los pacientes de trasplante dieron valores de ATP de respuesta inmunitaria de menos de 525 ng/ml. El noventa y cuatro (94%) de pacientes aparentemente sanos dieron niveles de ATP de respuesta inmunitaria de más de 225 ng/ml. Esto permite la caracterización de la respuesta inmunitaria de un paciente a cualquier punto en el tiempo como baja (≤ 225), moderada (>225 pero <525) o fuerte (≥ 525). También se muestra la distribución de pacientes con VIH inmunosuprimidos inducidos por virus. Esta población inmunosuprimida era estadísticamente similar a receptores de trasplante con una respuesta inmunitaria promedio de 287 ng/ml de ATP.

La mayoría de los fármacos inmunosupresores se administran actualmente basándose en el peso corporal¹³. Aún está claro que los niveles iniciales de respuesta inmunitaria en pacientes que esperan un trasplante varían enormemente. En la actualidad, no está disponible ningún método para evaluar la reactividad inmunitaria basal del paciente o su respuesta inicial a la terapia. En un esfuerzo por predecir mejor la eficacia terapéutica, Kahan²² ha propuesto que los pacientes se sometan a un régimen de dosificación de ensayo antes de la cirugía. Aunque esto no siempre puede ser práctico, un ensayo que mide una respuesta inmunitaria global, como la activación inducida por PHA, puede detectar el efecto neto de la cirugía, la anestesia, las transfusiones y los fármacos terapéuticos sobre la inmunosupresión. Por tanto, tras el trasplante, se distribuyeron estadísticamente las respuestas del paciente a tres niveles de reactividad mediante el ensayo de función inmunitaria CylexTM: baja, moderada o fuerte. Estas agrupaciones proporcionan mediciones relativas de reactividad, especialmente cuando el paciente se usa como su propio control para determinaciones posteriores. Tras la cirugía y la conversión a terapia oral, el estado de la reactividad inmunitaria para cada paciente podría evaluarse antes de su alta. Una vez que el paciente se estabiliza en el período tras el trasplante, el ensayo tiene utilidad como medición del cumplimiento con la terapia. El ensayo CylexTM ImmuKnowTM también puede usarse para medir la respuesta inmunitaria durante la retirada gradual de los pacientes de sus fármacos inmunosupresores. La reducción de la dosis farmacológica da como resultado un aumento correspondiente en la actividad de respuesta inmunitaria.

Este ejemplo demuestra que la distribución de respuestas inmunitarias en adultos sanos en comparación con receptores de trasplantes es estadísticamente diferente. Estas diferencias pueden usarse para clasificar la respuesta inmunitaria de un receptor de trasplante como fuerte, moderada o baja con el fin de evaluar el impacto farmacodinámico relativo de los fármacos inmunosupresores en el manejo del paciente de trasplante. De manera similar, este ejemplo demuestra que la tecnología puede aplicarse además a otras poblaciones inmunosuprimidas tales como individuos infectados con VIH.

Ejemplo 3. Comparación centro a centro

Se emprendió un estudio para establecer la regularidad de los resultados obtenidos usando los métodos de la presente invención en varios centros clínicos diferentes. Las distribuciones en la figura 3 muestran que no hay diferencias significativas en las respuestas inmunitarias de los pacientes en cada uno de los tres centros clínicos. El centro 1 (n=31) tenía una respuesta inmunitaria de pacientes de trasplantes media de 300 ng/ml de ATP que no era estadísticamente diferente del centro 2 (n= 49) o el centro 3 (n=47) con valores de respuesta inmunitaria medios de 296 y 256 ng/ml de ATP respectivamente.

La respuesta inmunitaria media en dos de los tres centros se encuentra dentro de la zona moderada. La población de pacientes en el centro 3, que incluía un gran número de trasplantes de hígado, se encontraba ligeramente por debajo de la zona moderada, los que concuerda con la mayor inmunosupresión neta en estos pacientes que resulta de los efectos agregados de una cirugía más traumática y un funcionamiento biológico inferior.

A pesar de las diferencias en las poblaciones, los protocolos terapéuticos y el tipo de trasplante, los tres centros tuvieron unos resultados equivalentes tal como se determina mediante la prueba de la t de dos colas convencional. Además, cada laboratorio estaba equipado con luminómetros, fabricados por diferentes proveedores, y los ensayos los realizaron técnicos con un intervalo de experiencia de laboratorio anterior. Los tres centros demostraron competencia en el uso de la prueba. Tradicionalmente, los ensayos para la inmunidad mediada por células han sido difíciles de normalizar. Para el ensayo de función de células inmunitarias CylexTM ImmuKnowTM, se ejecuta una curva de calibración de ATP sobre cada placa y los reactivos se han fabricado según las buenas prácticas de fabricación (. "Good Manufacturing Practices", GMP).

Estos resultados demuestran que la metodología descrita es aplicable a múltiples protocolos inmunosupresores tal como se usan por diferentes instituciones médicas.

Ejemplo 4. Variables de origen étnico y género

También se examinaron las variables de género y origen étnico. Las respuestas inmunitarias de hombres y mujeres receptores de trasplantes tal como se mide mediante la producción de ATP no eran estadísticamente significativas, aunque los hombres tenían respuestas inmunitarias 53 ng/ml de ATP inferiores a las mujeres. Se observó esta misma tendencia en adultos aparentemente sanos en la que los hombres dieron respuestas inmunitarias estadísticamente inferiores que las mujeres ($p < 0,04$). Además, las respuestas inmunitarias de afroamericanos y sujetos de raza blanca no pudieron distinguirse estadísticamente dentro de poblaciones de pacientes de trasplante o dentro de poblaciones adultas aparentemente sanas respectivamente. Sin embargo, en promedio, los afroamericanos reciben dosis de fármacos inmunosupresores superiores en cada uno de los centros clínicos.

En el pasado reciente, la incidencia de rechazo de trasplante de órganos en afroamericanos ha sido significativamente superior que para sujetos de raza blanca^{16,23,24,25}. Esta diferencia se ha atribuido a un aumento del metabolismo de fármacos inmunosupresores por afroamericanos. Como resultado, la mayoría de los protocolos para afroamericanos refleja ahora el uso de dosis superiores de fármacos inmunosupresores. Las tres instituciones en este ensayo multicéntrico se adhieren a tales protocolos. Por tanto, se analizó esta población de pacientes de trasplante basándose en el origen étnico. Los resultados demostraron que no hay diferencias estadísticas entre afroamericanos, sujetos de raza blanca y otros grupos étnicos entre receptores de trasplantes con respecto a la inmunosupresión promedio lograda. Una de las cuestiones que podrían hacerse es si los adultos sanos demuestran respuestas iniciales diferentes. Aparentemente, los adultos sanos dieron también niveles de respuestas inmunitarias equivalentes en este ensayo. Por tanto, se ha logrado una supresión funcional equivalente de todos los grupos étnicos en los tres centros, tal como se mide mediante este ensayo.

También se hicieron comparaciones estadísticas de los niveles de respuesta inmunitaria basándose en el género. Entre adultos aparentemente sanos, se observó una diferencia ligeramente significativa entre hombres y mujeres, demostrando los hombres respuestas inmunitarias inferiores. Entre los receptores de trasplantes, aunque las diferencias no eran estadísticamente significativas, los hombres dieron de nuevo respuestas inferiores a PHA en este ensayo en comparación con las mujeres.

Este ejemplo demuestra que a pesar de las diferencias en los protocolos de dosificación de fármacos para afroamericanos y sujetos de raza blanca, logran niveles similares de impacto inmunosupresor. Individualizando el manejo de fármaco inmunosupresor del paciente, pueden superarse el género y la diferencia étnica en la respuesta inmunitaria mediante el cambio de la dosificación de la medicación. Puede prevenirse la sobremedicación basada en el origen étnico solo monitorizando el paciente usando el ensayo Cylex™.

Ejemplo 5. Comparación de la respuesta de función de células inmunitarias Cylex™ entre tipos de órganos trasplantados

Cuando se determina la respuesta inmunitaria promedio para pacientes que reciben riñones frente a hígados o páncreas o páncreas y riñón simultáneos (SPK), los receptores de riñón presentan respuestas inmunitarias más fuertes en promedio que los que reciben o bien hígado o bien páncreas (figura 4) ($p < 0,05$). Aunque la mayoría de los protocolos prescriben dosis superiores de fármacos inmunosupresores para receptores de riñón que hígado o páncreas, los pacientes de trasplante de hígado están generalmente más gravemente enfermos. Una explicación adicional de que los receptores de trasplante de hígado estén más suprimidos es que el metabolismo alterado en el hígado conduce a un aumento de los niveles de fármacos y a una semivida prolongada y por tanto a inhibición de la inmunidad.

En este estudio, los receptores de trasplante de riñón dieron respuestas inmunitarias estadísticamente más fuertes que hígado o páncreas (o bien solos o bien simultáneamente con riñón). Estos resultados enfatizan la importancia de medir la inmunosupresión neta del paciente, puesto que está bien documentado que el traumatismo, la anestesia, la transfusión y la enfermedad subyacente del paciente, así como los fármacos terapéuticos contribuyen todos al nivel eficaz de inmunosupresión. Por tanto, la observación de que los pacientes de trasplante de hígado, que reciben dosis inferiores de fármacos inmunosupresores pero también experimentan más traumatismos y están generalmente más enfermos que pacientes de trasplantes de riñón, demuestran realmente niveles inferiores de reactividad inmunitaria. Estos otros factores contribuyen indudablemente más en el periodo tras el trasplante temprano (3 meses) y pueden explicar otra observación de este estudio de que se mide mayor inmunosupresión en el periodo tras el trasplante más "estable", a pesar de la reducción en la dosificación de fármacos inmunosupresores.

Este ejemplo demuestra que la capacidad para mediar la inmunosupresión neta de un receptor de aloinjerto teniendo en cuenta los efectos de medicaciones, el tipo de aloinjerto, el tiempo tras el trasplante, el traumatismo y la salud general es valiosa en el manejo de un paciente de trasplante apropiadamente.

Ejemplo 6. Falta de correlación directa entre el nivel de respuesta inmunitaria del paciente y el nivel de fármaco terapéutico en sangre

Puesto que la mayoría de los pacientes en este estudio recibieron terapia con tacrolimús, se realizó una

comparación entre el nivel de tacrolimús en sangre completa detectado mediante inmunoensayo, y el ensayo de función de células inmunitarias Cylex™ (véase la figura 5). No se observó ninguna correlación ($r^2 = 0,02$), enfatizando la importancia de medir un efecto directo del fármaco sobre el parámetro del sistema inmunitario en tiempo real.^{4,12}

Quizás la observación más importante a partir de este ensayo es que el nivel de tacrolimús medido mediante inmunoensayo de sangre completa no está correlacionado con el grado de inmunosupresión biológica medido mediante los niveles de ATP inducidos por PHA.

Se sabe bien que debido a diferencias farmacocinéticas entre individuos, la dosis de inhibidor de calcineurina administrada no se correlaciona con el nivel analítico medido en la sangre. Estos datos enfatizan la importancia de tener una lectura funcional de la inmunosupresión. Tanto Ahmed⁴ como Shulick¹² han proporcionado datos similares usando medidas basadas en citocina de la función de células T.

Este ejemplo demuestra que la medición analítica de fármaco inmunosupresor no es un reflejo adecuado del impacto farmacodinámico del fármaco.

Ejemplo 7. Intervalo de respuesta de células inmunitarias frente a tiempo desde el trasplante

Basándose en los puntos de corte establecidos estadísticamente en este estudio, se representó gráficamente la proporción de pacientes con trasplante que tuvieron una respuesta baja (≤ 225 ng/ml de ATP) o una respuesta fuerte (≥ 525 ng/ml de ATP) en este ensayo frente al tiempo tras el trasplante (véase la figura 6). En los dos primeros meses tras el trasplante, el 50% de los pacientes recién trasplantados demostró niveles de ATP de función de células inmunitarias superiores a 525 ng/ml y la menor proporción (~30%) dio niveles de ATP inferiores a 225 ng/ml. A lo largo de los siguientes meses, la proporción de pacientes que mostraban niveles de ATP inducidos por PHA < 225 ng/ml aumentó regularmente. En el intervalo de 6-12 meses, ningún paciente reaccionó en la zona de respuesta inmunitaria fuerte (≥ 525 ng/ml). La mayor desviación en los grupos de pacientes con respuesta inmunitaria baja y fuerte se produjo un año o más después del trasplante con una ligera alza en los valores de ATP ≥ 525 ng/ml a los 4 años.

Cuando se representa gráficamente la proporción de pacientes con trasplante con niveles de ATP de respuesta inmunitaria de ≥ 525 ng/ml o ≤ 225 ng/ml como función del tiempo, no es sorprendente que el mayor número de pacientes en los extremos de este ensayo se produce en los primeros meses tras el trasplante. En este ensayo multicéntrico, 6-12 meses parecieron ser el punto de mayor estabilidad, sin haber ningún paciente con valores superiores a 525 ng/ml. En puntos posteriores (> 1 año), la proporción de pacientes con niveles de respuesta inmunitaria ≤ 225 ng/ml aumenta. Parecería que una vez que los pacientes se han recuperado del traumatismo de la cirugía, la eficacia de la terapia inmunosupresora parece aumentar a lo largo del tiempo, a pesar de una dosificación inferior de estos fármacos. Esto demuestra de nuevo la importancia de la medición de la inmunosupresión neta, lo que puede indicar que hay un fundamento adicional que respalda el ajuste individualizado de la terapia inmunosupresora. La disponibilidad de una medición directa de la actividad del sistema inmunitario que refleja la potencia de la terapia en tiempo real proporciona un mecanismo para el ajuste del fármaco. El ensayo también responde fácilmente a terapias de intervención, de modo que ahora puede calibrarse el impacto relativo de tales terapias, reflejando mejor la respuesta individualizada de un paciente a estos fármacos. En último lugar, terapias personalizadas ofrecen la promesa de reducir las morbididades a largo plazo asociadas con el uso prolongado de estos fármacos sin poner en peligro la vida del órgano trasplantado.

Este ejemplo demuestra que la mayoría de los pacientes que reciben terapia inmunosupresora durante periodos de tiempo prolongados (superiores a un año) muestran altos niveles de supresión funcional de la inmunidad que no se correlacionan con el nivel de fármaco en la sangre, que con frecuencia está en su punto inferior.

Ejemplo 8. Predicción del riesgo de rechazo

Normalmente, se administra una dosis alta de un fármaco inmunosupresor a un paciente inmediatamente después de la cirugía de trasplante, y va seguida por dosis adicionales administradas diariamente. Se realizan ensayos de monitorización farmacológica y ensayos de función orgánica, (por ejemplo creatinina) de manera mensual. El ensayo de función de células inmunitarias Cylex™ puede realizarse simultáneamente para detectar cambios en la respuesta inmunitaria a lo largo de un periodo de tiempo. Por ejemplo, resultados que muestran una progresión de la respuesta inmunitaria desde el intervalo bajo (≤ 225 ng/ml de ATP), a través del intervalo moderado y hasta el intervalo fuerte (≥ 525 ng/ml de ATP) pueden servir como marcador de precaución de posible rechazo agudo, permitiendo al médico encargado aumentar el fármaco o introducir una terapia de rescate con dosis de fármaco alternativas, o el uso en combinación con otros, o iniciar otras pruebas clínicas confirmatorias (por ejemplo, biopsia de órganos).

ESTUDIO DE CASO 1: La terapia de inducción en receptores de trasplante conduce a una drástica disminución en el número total de linfocitos circulantes y se pretende que reduzca los episodios de rechazo agudo. Este estudio de caso notifica el transcurso clínico de un paciente monitorizado mediante el ensayo de función de células inmunitarias

Cylex™ durante 1 año tras el trasplante (figura 7).

Un hombre de raza blanca de 51 años de edad con enfermedad renal en fase terminal (ESRD) secundaria a glomerulonefritis recibió un riñón de haplotipo coincidente de un familiar vivo. El protocolo de inmunosupresión consistió en inducción con anticuerpos anti-CD52 y terapia de mantenimiento con sirolimús. Se monitorizó la respuesta inmunitaria del paciente mediante los métodos de la presente invención.

Para realizar el ensayo, se diluyeron 200 µl de sangre completa anticoagulada con heparina sódica, se alicuotó en pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos y se estimuló durante la noche con PHA. Entonces se seleccionaron células CD4+ usando partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo, se lavaron y se lisaron para liberar ATP intracelular. Se cuantificó la intensidad de la respuesta inmunitaria del paciente midiendo la cantidad de ATP intracelular producida en respuesta a la estimulación.

El tratamiento con anticuerpos anti-CD52 en el trasplante condujo a un profundo agotamiento de linfocitos, pero la intensidad de la respuesta inmunitaria tras el trasplante realmente aumentó desde antes del trasplante hasta el día 13, véase la figura 7. En el día 23, una biopsia de protocolo reveló un rechazo Banff Ib (en ausencia de un aumento significativo de creatinina). La terapia de rescate consistió en tratamiento con Solumedrol, un agente de disminución gradual de prednisona, y sirolimús. Tras este tratamiento, la respuesta inmunitaria del paciente disminuyó, lo que indica un aumento en el nivel de inmunosupresión. Durante este periodo, la dosificación de fármaco sirolimús permaneció constante, los niveles de creatinina fueron estables, y los recuentos de linfocitos aumentaron progresivamente.

Por tanto, la terapia de inducción inicial con anticuerpos anti-CD52 condujo a una reducción en el número absoluto de linfocitos circulante. Sin embargo, una disminución del número de células no se tradujo en una supresión de la respuesta inmunitaria funcional del paciente. El nivel de respuesta inmunitaria tras la inducción aumentó con respecto al valor antes del trasplante y se asoció con rechazo. El paciente presentó rechazo aproximadamente una semana después, a pesar de recuentos de linfocitos absolutos drásticamente inferiores, necesitando modificaciones en el régimen farmacológico.

La capacidad de respuesta de linfocitos circulantes es una medida crítica en la evaluación de la eficacia de la terapia inmunosupresora. Este ejemplo demuestra que a pesar de un agotamiento de linfocitos eficaz y la terapia inmunosupresora en curso, los linfocitos permanecieron metabólicamente activos según se mide mediante el ATP y tal como se refleja en el acontecimiento de rechazo subsiguiente. ImmuKnow™ proporciona un valioso complemento a otros parámetros clínicos en la monitorización de pacientes tras el trasplante.

ESTUDIO DE CASO 2. Tras el rechazo, la duración de la infusión de anticuerpo monoclonal OKT3 (anti-CD3) (de 7 a 14 días junto con esteroides) se basa en el grado de rechazo según evalúa mediante biopsia. A rechazos de leves a moderados se les puede proporcionar un tratamiento de 7 días mientras que rechazos graves justifican un ciclo de 14 días. Este estudio de caso describe el transcurso clínico de un receptor de trasplante multivisceral tras el tratamiento para rechazo agudo con OKT3 y Solumedrol dependiendo de su respuesta inmunitaria (figura 8).

Se trató a una mujer afroamericana de 48 años de edad con rATG y se le administró infusión de células de médula ósea de donante antes de recibir un trasplante multivisceral irradiado (intestino delgado). Recibió tacrolimús como terapia de mantenimiento.

Para realizar el ensayo de función de células inmunitarias Cylex™, se diluyeron 200 µl de sangre completa anticoagulada con heparina sódica, se alicuotó en pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos y se estimuló durante la noche con PHA. Entonces se seleccionaron células CD4+ usando partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo, se lavaron y se lisaron para liberar el ATP intracelular. Se cuantificó la intensidad de la respuesta inmunitaria de la paciente midiendo la cantidad de ATP intracelular producida en respuesta a la estimulación. Se diagnosticó rechazo agudo mediante estudios histopatológicos de biopsias mucosas múltiples al azar y guiadas endoscópicamente. Para tratar el rechazo agudo, se administraron a la paciente infusiones de OKT3 a 10 mg/día junto con Solumedrol y tacrolimús i.v.

Tras un periodo de estabilización tras el trasplante, se inició la disminución gradual de tacrolimús. En la semana 38, se le diagnosticó a la paciente rechazo agudo y se le administró infusión de OKT3/FK y Solumedrol. En la semana 39, la respuesta inmunitaria medida mediante ensayo de función de células inmunitarias Cylex™ era extremadamente alta (ATP = 954 ng/ml, véase la figura 8). Se administró un ciclo adicional de tres días de OKT3, en vez de 7 días. La respuesta inmunitaria disminuyó a la mitad (ATP = 582 ng/ml) y se detuvieron OKT3 y Solumedrol. La respuesta inmunitaria continuó disminuyendo durante la semana 41, pero aumentó hasta el extremo superior de la zona moderada dos semanas después (semana 43). Se reinició el tratamiento con Solumedrol y la respuesta inmunitaria disminuyó significativamente (semana 44). Actualmente la paciente está clínicamente estable.

Una vez que el sistema inmunitario de un receptor comienza a rechazar un aloinjerto, se requieren inmunosupresores extremadamente potentes para limitar el daño o la posible pérdida del órgano. Hasta hace poco,

el tipo y la dosificación de fármaco(s) y el periodo de tiempo requerido para rescatar un acontecimiento de rechazo agudo se basaban principalmente en resultados de biopsia solos. El ensayo de función de células inmunitarias Cylex™ proporciona una medida de la respuesta inmunitaria global de un paciente que incorpora el impacto agregado de múltiples fármacos, y el estado clínico del paciente. Tal como se muestra en la figura 8, el tratamiento inicial con OKT3 no redujo adecuadamente la respuesta inmunitaria del paciente. Se necesitó un segundo tratamiento, pero el periodo de tiempo habitual se redujo desde 7 hasta 3 días. Complementando la terapia de mantenimiento de tacrolímús con esteroides, este paciente está ahora clínicamente estable con un órgano intacto, funcional y libre de rechazo. El ensayo de función inmunitaria Cylex™ ImmKnow™ evaluó la eficacia de la terapia de rescate y ayudó a limitar la cantidad de inmunosupresores administrados a este paciente.

El ensayo de función de células inmunitarias Cylex™ proporciona una medida del impacto agregado de la terapia inmunosupresora, permitiendo al médico individualizar mejor el ciclo de terapia de un paciente.

Ejemplo 9: Predicción del riesgo de infección

Se reduce una dosis de un fármaco inmunosupresor tal como rapamicina a lo largo del tiempo según un protocolo durante la terapia posterior a un trasplante de hígado. Se realizan ensayos de monitorización farmacoterapéutica mensualmente que indican que los niveles valle de fármaco están dentro de un intervalo esperado.

El ensayo Cylex™ realizado al mismo tiempo detecta una disminución continuada inesperada en la respuesta inmunitaria a lo largo de un periodo de tiempo prolongado desde el intervalo moderado (>225 ng/ml de ATP, <525 ng/ml de ATP) hasta el intervalo bajo (≤ 225 ng/ml de ATP). Una monitorización adicional indica una disminución continuada a lo largo del tiempo. Estos resultados sirven como indicación del posible riesgo de infección oportunista debido a la sobremedicación, y permite al médico reducir las dosis de fármacos o iniciar otras pruebas clínicas confirmatorias (por ejemplo, biopsia de órganos o análisis de función orgánica). Véanse los estudios de caso 1 y 2.

Ejemplo 10: Predicción de desenlace favorable

Se administra un fármaco inmunosupresor tal como ciclosporina a lo largo de un periodo de tiempo prolongado tras cirugía de trasplante de corazón. Durante este tiempo, se retira gradualmente el fármaco con el fin de evitar efectos tóxicos a largo plazo. La monitorización del nivel de fármaco refleja esta disminución, sin embargo el ensayo de función inmunitaria Cylex™ realizado simultáneamente indica que la respuesta inmunitaria del paciente permanece dentro del intervalo moderado (>225 ng/ml de ATP, <525 ng/ml de ATP). Esto indica que hay poca posibilidad de rechazo o daño al órgano debido a toxicidad.

Bibliografía

1. UNOS, 2001 International Transplant Directory. Transplant News; Transplant Communications Inc., Fresno, CA.
2. Rovira, P, Mascarell, L and Truffa-Bachi, P. The Impact of Immune Suppressive Drugs on the Analysis of T Cell Activation. Current Medicinal Chem. 2000(7):673-692.
3. Venkataraman, R, Shaw, LM, Sarkozi, L, Mullins, R, Pirsch, J, et al. Clinical Utility of Monitoring Tacrolimus Blood Concentrations in Liver Transplant Patients. J Clin. Pharm. 2001; 41:542-551.
4. Ahmed, M, Vankataraman, R, Logar, AJ, Rao, AS, Bartley, GP, Robert, K, Dodson, FS, Shapiro, R, Fung JJ and Zeevi, A. Quantitation of Immunosuppression by Tacrolimus Using Flow Cytometric Analysis of Interleukin-2 and Y-Interferon and Inhibition in CD8- and CD8+ Peripheral Blood T Cells, Therapeutic Drug Monitoring 2001; 23(4): 354-362.
5. Weir, ML Methods for Measurement of Lymphocyte Function. U.S. Patent #5,773,232: 1998.
6. Hawkins, DM Diagnostics for Conformity of Paired Quantitative Measurements, In: Statistics in Medicine: 2001
7. Rocke, DM and Lorenzato, S. A Two-Component Model for Measurement Error in Analytical Chemistry, Technometrics, 1995; 37, 176-184.
8. Buttgereit, F, Burmester, G-R, Brand, MD. Bioenergetics of Immune Functions.. Fundamental and Therapeutic Aspects. Immunol. Today 2000; 21: 192-199.
9. Britz, JA, Sottong, P and Kowalski, R. In vitro CMI™: Rapid Assay for Measuring Cell-Mediated Immunity. In: Luminescence Biotechnology Instruments and Applications. Ed. Van Dyke, Van Dyke and Woodfork, CRC Press. 2002; p.331-344.

10. Sottong, PR, Rosebrock, JA, Britz, JA and Kramer, TR. Measurement of T-lymphocyte Responses in Whole Blood Cultures Using Newly Synthesized DNA and ATP. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2000; Vol. 7:307-311.
- 5 11. Halsey, JF, New Methods, Clinical Applications of T Cell Functional Assays. *Advance/Laboratory*. October 2001; p67-72.
- 10 12. Schulick, RD, Weir, MB, Miller, MW, Cohen, DJ, Bernas, BL and Shearer, GM. Longitudinal Study of In Vitro CD4+ Helper Cell Function in Recently Transplanted Renal Allograft Patients Undergoing Tapering of their Immunosuppressive Drugs, *Transplantation*. 1993; Vol. 56 No. 3:590-596.
13. Danovitch, GM. Current Immunosuppressive Regimes in Organ Transplantation. *Kidney International*. 2001. Vol. 59:p388-402.
- 15 14. Danovitch, GM. Immunosuppressive medications for renal transplantation: A multiple choice question. *International Society of Nephrology. Kidney International*. 2001 Vol:59:388-402.
- 20 15. Jusko, WJ, Thomson, AW, et al. Consensus Document: Therapeutic Monitoring of Tacrolimus (FK-506). *Ther. Drug Monitoring*; 1995; 17:606-614.
- 25 16. Burdick, JF, Shinozuka, N. Immune Monitoring for Transplant Recipients. In: *Kidney Transplant & Rejection: Diagnosis and Treatment*. Ed. Racusen, Dekker, Marcel Inc. 1998; p563-575.
17. Zeevi, A, Bentlejewski, C, Spichty, K, Griffith, B, Abu-Elmagd, K, Hooper, N, Kowalski, R, and Fung, J. Post Transplant Immune Monitoring-ATP Based Assay for T Cell activation. Presented at 2001 Clinical Histocompatibility Workshop, Honolulu, HI
- 30 18. Fletcher, MA, Urban, RG, Asthana, D. , Walling, J. , Friedlander, A. , Page, J. B. Lymphocyte Proliferation, In: Rose, N. R. , et al (eds.), *Manual of Clinical Laboratory Immunology* : 5th Ed. American Society for Microbiology, 1997; p313-319. Washington, DC.
19. Liu, J, Farmer, JD, Lane, WS, et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. 1991. *Cell* 66 : 807-901.
- 35 20. Karlsson H, DePierre JW, Nassberger, L. Energy Levels in Resting and Mitogen-Stimulated Human Lymphocytes During Treatment with FK506 or Cyclosporin A In Vitro. 1997. *Biochim Biophys Acta*. 1319 (2-3): 301-310.
- 40 21. Horigome, A, Hirano T, Oka, K. Tacrolimus-Induced Apoptosis and its Prevention by Interleukins in Mitogen-Activated Human Peripheral-Blood Mononuclear Cells. 1998. *Immunopharmacology* 39 (1): 21-30.
22. Kahan, BD, M. Welsh, L. Rutzky, et al. The Ability of Pretransplant Test-Dose Pharmacokinetic Profiles to Reduce Early Adverse Events after Renal Transplantation. *Transplantation* 1992; 53: 345.
- 45 23. Butkus, DE, Meydrech, EF, Raju, SS. Racial Differences in the Survival of Cadaveric Renal Allografts. Overriding Effects of HLA Matching and Socioeconomic Factors. *N. Engl. J. Med*. 1992.327.-840-845.
24. Van Buren. DH. Renal Transplantation Outcomes in African-American Patients. *Transplant Immunol. Lett*. 1999.15 : 61-11.
- 50 25. Nagashima, N, Watanabe, T, Nakamura, M, Shalabi, A, Burdick, JF. Decreased Effect of limmunosuppression on Immunocompetence in African-Americans After Kidney and Liver Transplantation, *Clin. Transplantation*. 2001.15 : 111-115.

REIVINDICACIONES

1. Método para evaluar una respuesta inmunitaria en un receptor de trasplante, que comprende las etapas de
5 determinar un valor del marcador metabólico intracelular adenosina trifosfato (ATP) de dicha respuesta inmunitaria en una muestra de linfocitos de dicho receptor tras su exposición al mitógeno fitohemaglutinina (PHA) como estimulante;
10 comparar dicho valor con valores en un conjunto de referencia que comprende intervalos de valores del marcador metabólico intracelular ATP de respuestas inmunológicas para linfocitos; y
15 evaluar dicha respuesta inmunitaria en dicho receptor basándose en una comparación realizada en dicha etapa de comparación, en el que dicho conjunto de referencia comprende intervalos de valores bajos, moderados o fuertes, en el que valores de dicho intervalo bajo son inferiores o iguales a 225 nanogramos de ATP por ml, valores de dicho intervalo moderado son superiores a 225 nanogramos de ATP por ml e inferiores a 525 nanogramos de ATP por ml, y valores de dicho intervalo fuerte son iguales o superiores a 525 nanogramos de ATP por ml.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de determinación se lleva a cabo proporcionando una muestra de sangre de dicho pacientes antes de o tras la administración de al menos un fármaco inmunosupresor, exponiendo dicha muestra de sangre a PHA como estimulante, seleccionando un conjunto o subconjunto de linfocitos de dicha muestra de sangre y midiendo un nivel de un marcador metabólico intracelular en dichos linfocitos.
- 25 3. Método según la reivindicación 1, en el que dicho ATP se mide mediante un ensayo de luciferasa.
4. Método según la reivindicación 1, en el que dicho método se lleva a cabo antes, después, o antes y después de la administración de al menos un fármaco inmunosupresor a dicho paciente.
- 30 5. Método según la reivindicación 4, en el que dicho al menos un fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en inhibidores de calcineurina, inhibidores enzimáticos, antimetabolitos, fármacos de reducción de linfocitos, corticosteroides y moduladores inmunitarios.
- 35 6. Método según la reivindicación 2, en el que dicha muestra de sangre es sangre completa.
7. Método según la reivindicación 1, en el que dicho receptor es un receptor de un trasplante seleccionado del grupo que consiste en corazón, pulmones, riñón, páncreas, hígado, intestino delgado, piel, tejidos o médula ósea.
- 40 8. Método para predecir un desenlace clínico o determinar un ciclo de tratamiento en un paciente de trasplante, en el que se administra al menos un fármaco inmunosupresor a dicho paciente, que comprende las etapas de determinar un valor de ATP como marcador metabólico intracelular de dicha respuesta inmunitaria en al menos una muestra de linfocitos de dicho paciente tras su exposición al mitógeno fitohemaglutinina (PHA) como estimulante;
45 comparar dicho valor con valores en un conjunto de referencia que comprende intervalos de valores del marcador metabólico intracelular de respuesta inmunológica para linfocitos; y
50 predecir dicho desenlace clínico o determinar dicho ciclo de tratamiento para dicho paciente basándose en una comparación realizada en dicha etapa de comparación, en el que dicho conjunto de referencia comprende intervalos de valores bajos, moderados o fuertes, en el que valores de dicho intervalo bajo son inferiores o iguales a 225 nanogramos de ATP por ml, valores de dicho intervalo moderado son superiores a 225 nanogramos de ATP por ml e inferiores a 525 nanogramos de ATP por ml, y valores de dicho intervalo fuerte son iguales o superiores a 525 nanogramos de ATP por ml.
- 55 9. Método según la reivindicación 8, en el que dicho valor se obtiene a partir de una pluralidad de muestras de linfocitos.
- 60 10. Método según la reivindicación 8, en el que dicha etapa de determinación se lleva a cabo proporcionando una muestra de sangre de dicho paciente antes o después de la administración de al menos un fármaco inmunosupresor,
exponiendo dicha muestra de sangre a PHA como estimulante,
65 seleccionando un conjunto o subconjunto de linfocitos de dicha muestra de sangre, y

mediando un nivel de un marcador metabólico intracelular en dichos linfocitos.

11. Método según la reivindicación 8, en el que dicho ATP se mide mediante un ensayo de luciferasa.
- 5 12. Método según la reivindicación 8, en el que dicho al menos un fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en inhibidores de calcineurina, inhibidores enzimáticos, antimetabolitos, fármacos de reducción de linfocitos, glucocorticoides y moduladores inmunitarios.
- 10 13. Método según la reivindicación 8, en el que dicho desenlace clínico se selecciona de rechazo de trasplante, sobremedicación, infección o estabilidad.
14. Método según la reivindicación 8, llevándose a cabo dicho método durante una fase de retirada gradual de dicho paciente de dicho al menos un fármaco inmunosupresor.
- 15 15. Método según la reivindicación 8, llevándose a cabo dicho método para establecer el cumplimiento con las medicaciones por dicho paciente.
- 20 16. Método para monitorizar una respuesta inmunitaria en un paciente de trasplante antes de o que recibe actualmente al menos un fármaco inmunosupresor, que comprende las etapas de determinar un valor de ATP como marcador metabólico intracelular de respuesta inmunológica en una única muestra de linfocitos tras la exposición al mitógeno fitohemaglutinina (PHA) como estimulante de dicho pacientes antes o después de la administración de al menos un fármaco inmunosupresor;
comparar dicho valor de los linfocitos muestreados con un conjunto de referencia que tiene intervalos
25 definidos de respuestas inmunológicas humanas a diversos niveles de reactividad de linfocitos; y
evaluar dicha respuesta inmunitaria en dicho paciente basándose en una comparación realizada en dicha
etapa de comparación, en el que valores de dicho intervalo bajo son inferiores o iguales a 226 nanogramos
de ATP por ml, valores de dicho intervalo moderado son superiores a 225 nanogramos de ATP por ml e
30 inferiores a 525 nanogramos de ATP por ml, y valores de dicho intervalo fuerte son iguales o superiores a
526 nanogramos de ATP por ml.
- 35 17. Método para predecir un desenlace clínico o ciclo de tratamiento en un paciente antes de recibir al menos un fármaco inmunosupresor, según reivindicación 8, que comprende las etapas de
determinar un valor de ATP como marcador metabólico intracelular de respuesta inmunológica de un
conjunto o subconjunto de linfocitos en una única muestra de sangre tras la exposición al mitógeno
fitohemaglutinina (PHA) como estimulante de dicho paciente antes o después de la administración de dicho
40 al menos un fármaco inmunosupresor;
comparar dicho valor de los linfocitos muestreados con un conjunto de referencia que tiene intervalos
definidos de respuesta inmunológica humana a diversos niveles de reactividad de linfocitos; y
predecir dicho desenlace clínico o determinar dicho ciclo de tratamiento para dicho paciente basándose en
45 una comparación realizada en dicha etapa de comparación.
- 50 18. Método para predecir un desenlace clínico o ciclo de tratamiento en un paciente que recibe al menos un fármaco inmunosupresor según la reivindicación 8, que comprende las etapas de
determinar un valor de ATP como marcador intracelular de una respuesta inmunológica de una muestra de
linfocitos de dicho paciente antes de la administración de cualquier fármaco y al menos una muestra de
linfocitos adicional de dicho paciente tras recibir dicho al menos un fármaco inmunosupresor tras la
exposición al mitógeno fitohemaglutinina (PHA) como estimulante;
55 comparar dichos valores de los linfocitos muestreados con un conjunto de referencia que tiene intervalos
definidos de respuesta inmunológica humana a diversos niveles de reactividad de linfocitos y entre sí; y
predecir dicho desenlace clínico o determinar dicho ciclo de tratamiento para dicho paciente basándose en
una comparación realizada en dicha etapa de comparación.
- 60 19. Método para predecir un desenlace clínico o ciclo de tratamiento en un paciente que recibe al menos un fármaco inmunosupresor según la reivindicación 8, que comprende las etapas de
determinar un valor de ATP como marcador metabólico intracelular de una respuesta inmunológica tras la
exposición al mitógeno fitohemaglutinina (PHA) como estimulante de dos o más muestras de linfocitos
65 recogidas a lo largo del tiempo de dicho paciente tras recibir al menos un fármaco inmunosupresor;

- comparar dichos valores de los linfocitos muestreados con un conjunto de referencia que tiene intervalos definidos de respuesta inmunológica humana a diversos valores de reactividad de linfocitos y entre sí; y
- 5 predecir dicho desenlace clínico o determinar ciclo de tratamiento para dicho paciente basándose en una comparación realizada en dicha etapa de comparación.
20. Método de determinación de un riesgo de rechazo en un paciente que ha recibido un trasplante que comprende monitorizar la respuesta inmunitaria en dicho paciente que comprende las etapas de
- 10 determinar los valores de ATP como marcador metabólico intracelular de dicha respuesta inmunitaria tras la exposición al mitógeno fitohemaglutinina (PHA) como estimulante en muestras de linfocitos de dicho paciente,
- 15 comparar dichos valores obtenidos a lo largo de un periodo de tiempo de varios días y si hay un aumento en el intervalo de al menos 50 nanogramos/ml de ATP, determinar que dicho paciente corre el riesgo de rechazo.
21. Método de determinación de la sobremedicación en un paciente que ha recibido un trasplante que comprende monitorizar la respuesta inmunitaria en dicho paciente que comprende las etapas de
- 20 determinar los valores de ATP como marcador metabólico intracelular de dicha respuesta inmunitaria en una muestra de linfocitos tras la exposición al mitógeno fitohemaglutinina (PHA) como estimulante de dicho paciente; comparar dichos valores obtenidos a lo largo de un periodo de tiempo de varios días y, si hay una disminución de al menos 50 nanogramos/ml de ATP, determinar que dicho paciente corre el riesgo de sobremedicación.
- 25

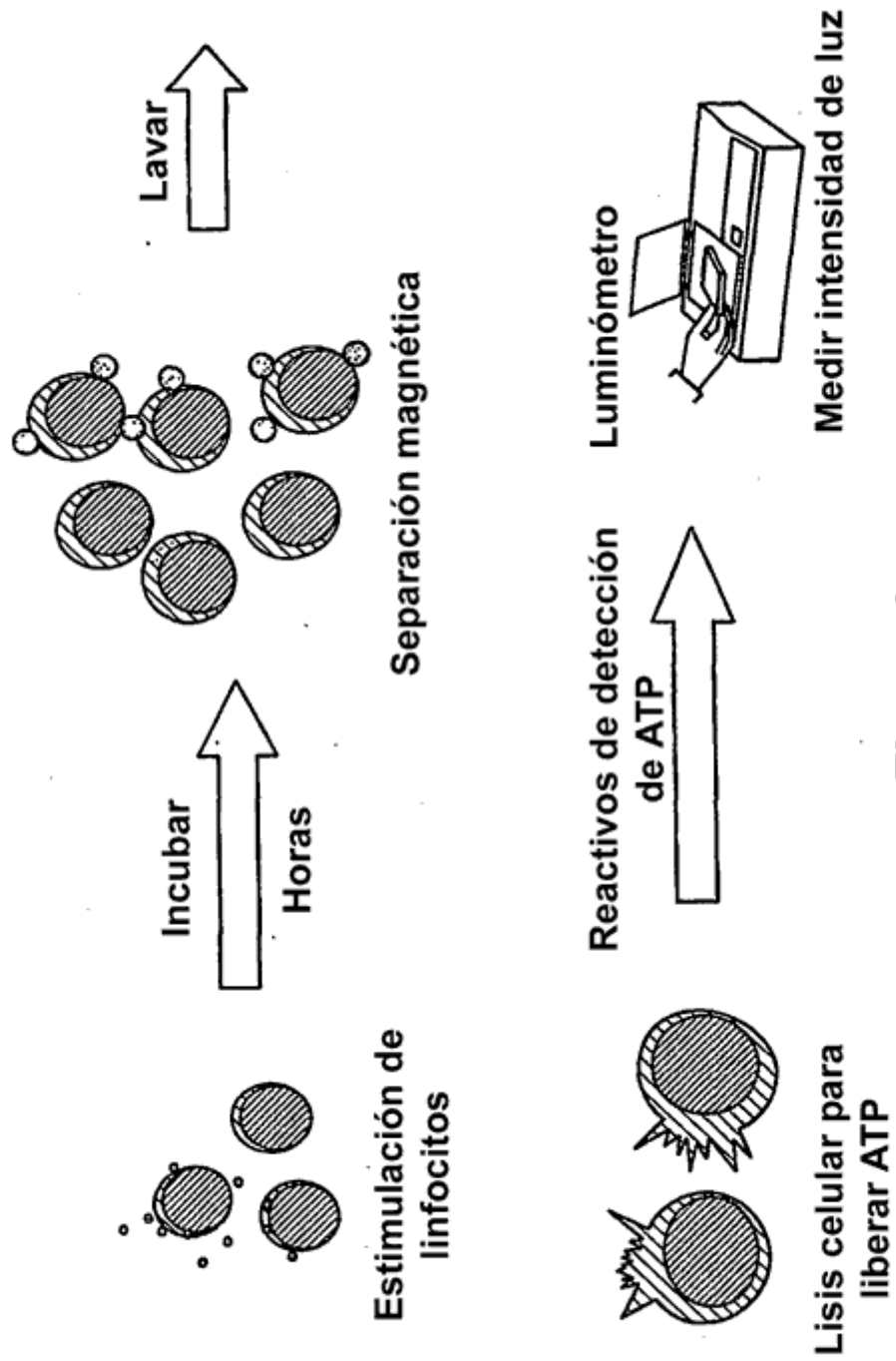


Figura 1

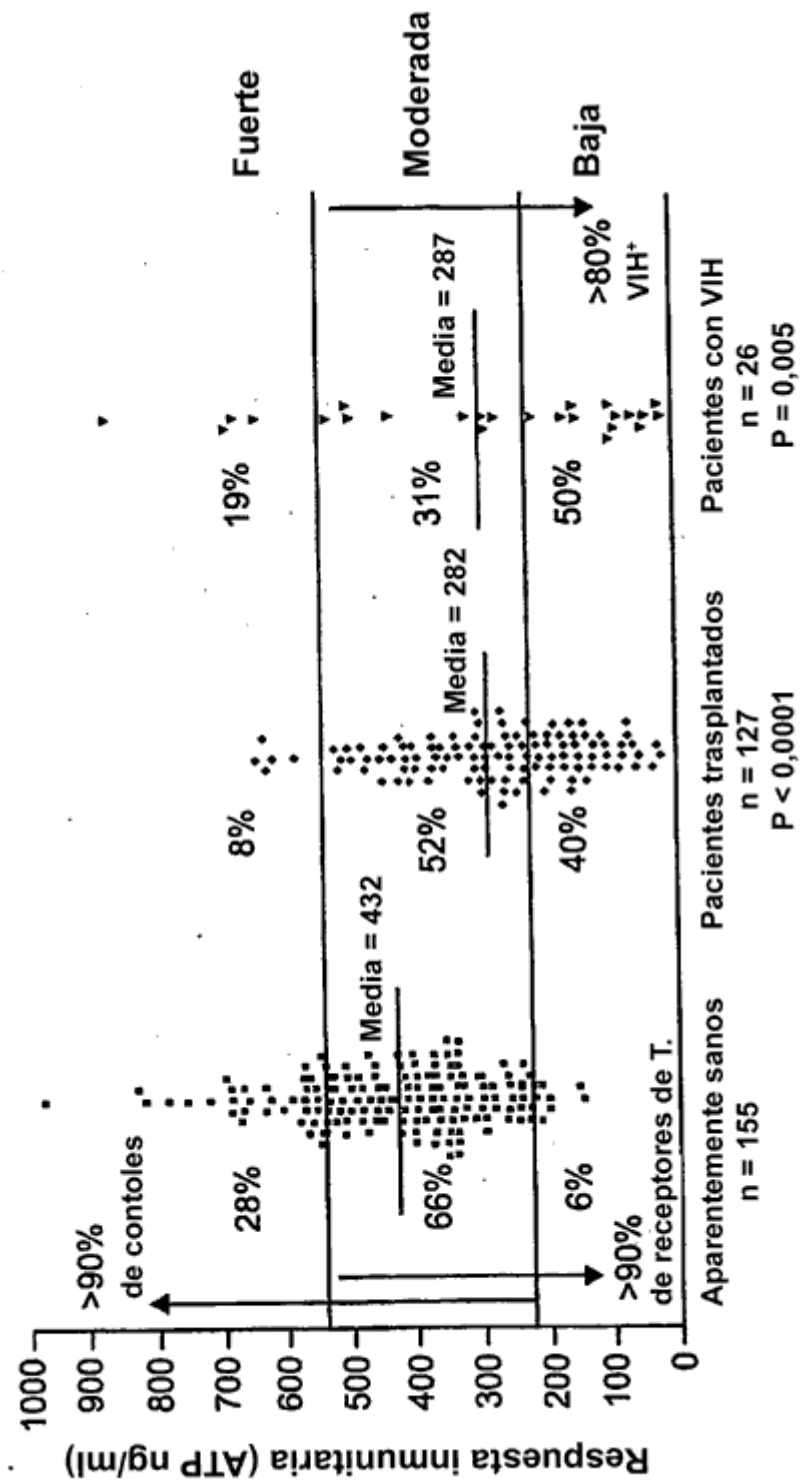


Figura 2

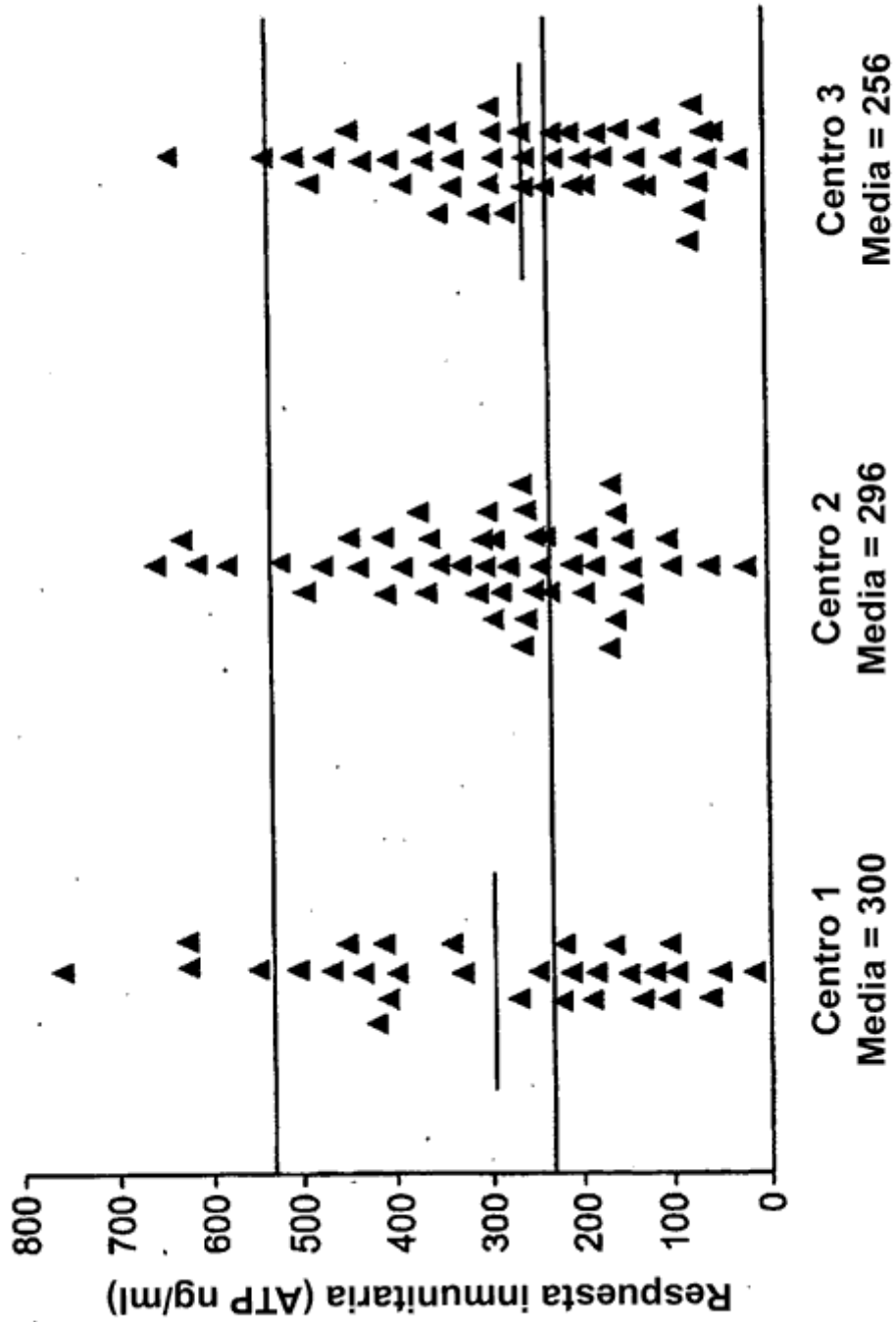


Figura 3

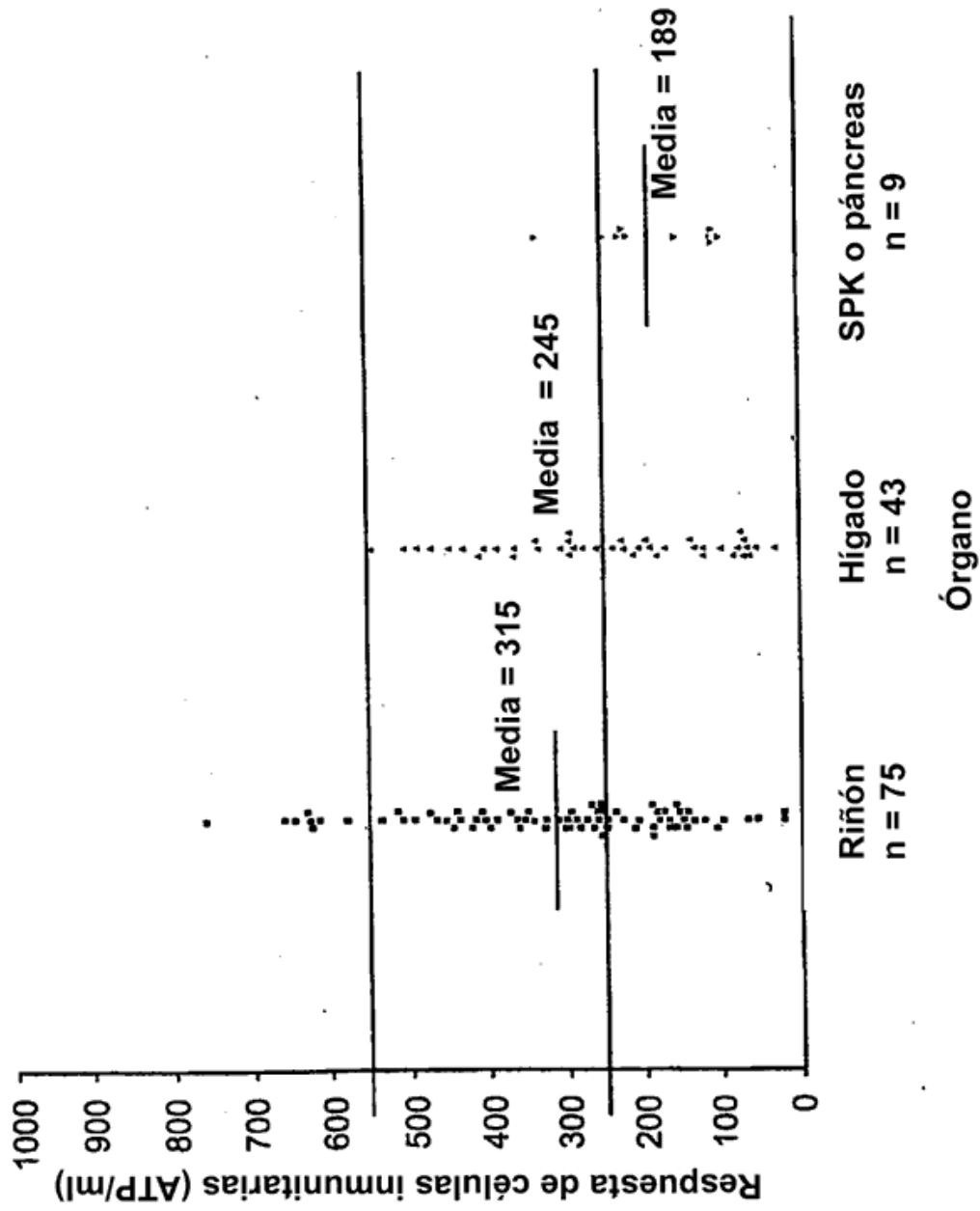


Figura 4

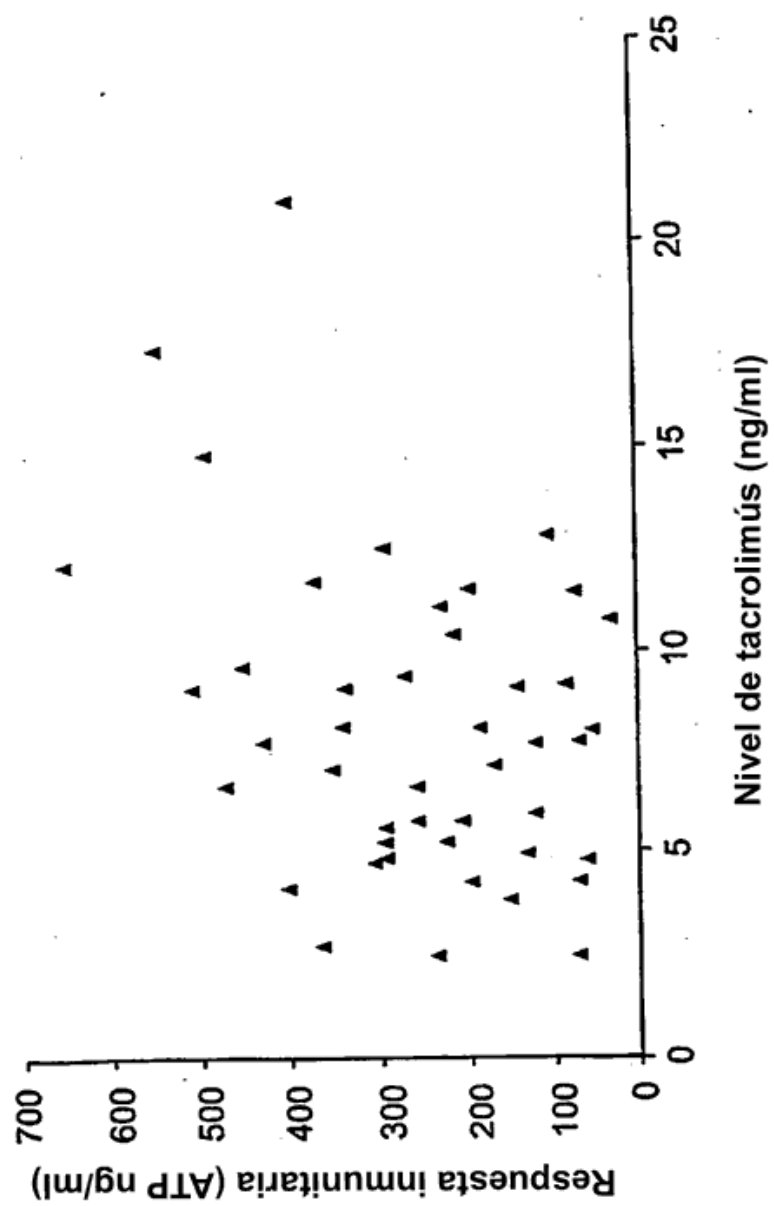


Figura 5

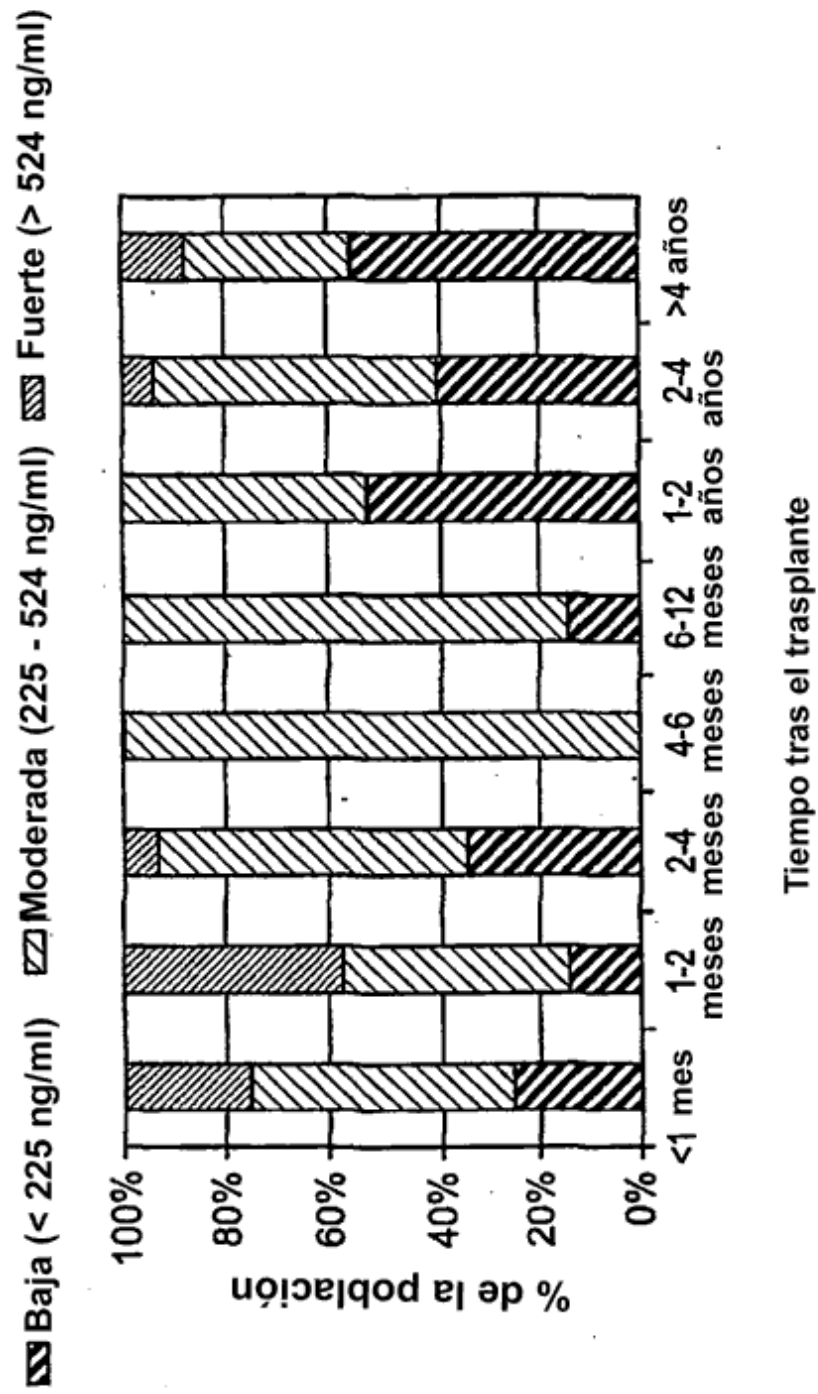


Figura 6

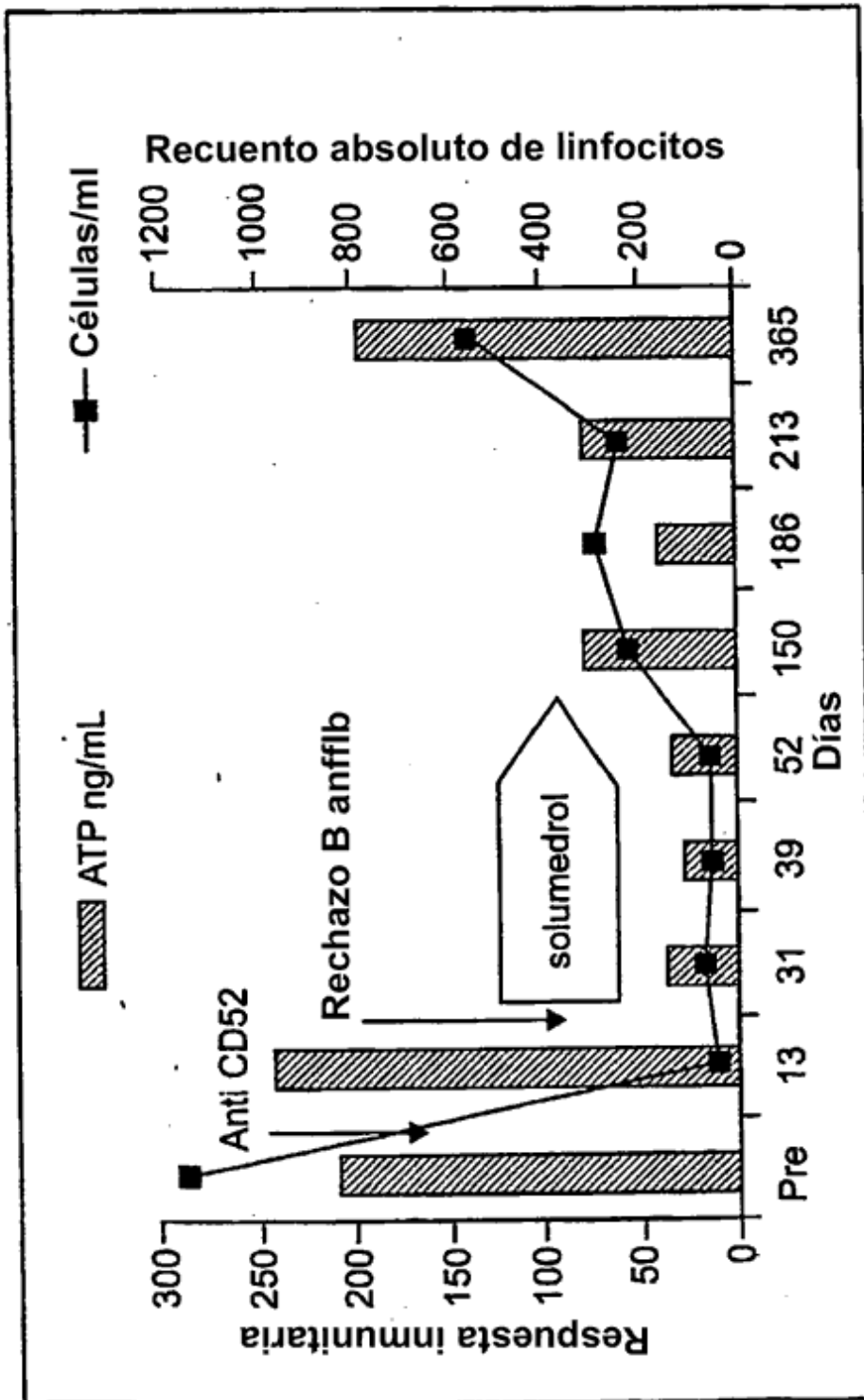


Figura 7

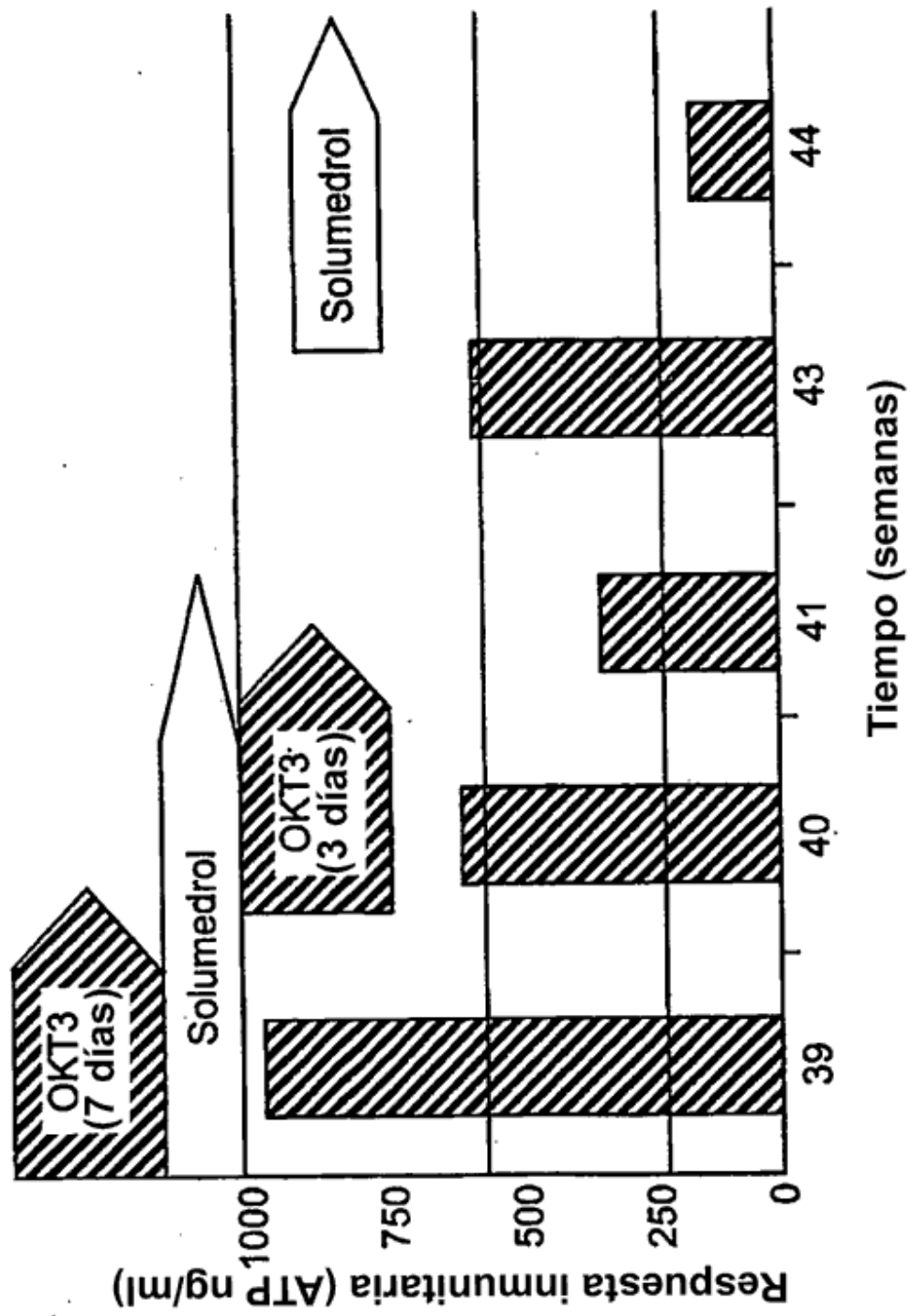


Figura 8