

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 498**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2011 PCT/US2011/031705**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011 WO11127360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2011 E 11766786 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2556377**

54 Título: **Ensayo de células presentadoras de antígenos de linfocitos B**

30 Prioridad:

08.04.2010 US 322234 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.11.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION (100.0%)
200 Gardner Steel Conference Center Thackeray
& O'Hara Streets
Pittsburgh, PA 15260, US**

72 Inventor/es:

**SINDHI, RAKESH y
ASHOKKUMAR, CHETHAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 643 498 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayo de células presentadoras de antígenos de linfocitos B

Ámbito de la divulgación

5 Esta divulgación hace referencia al campo de la inmunología y, en especial, a los métodos de diagnóstico y/o predicción de rechazo de un trasplante, por ejemplo, el rechazo celular agudo o el rechazo mediado por anticuerpos (humoral) de un trasplante de órganos o la enfermedad del injerto contra huésped.

Antecedentes

10 Los órganos y tejidos trasplantados son vulnerables al rechazo; el rechazo celular agudo (ACR) y el rechazo humoral (HR) son dos formas de rechazo al trasplante. Cualquiera de estos dos procesos comienza con la captación de un antígeno extraño por una célula presentadora de antígeno (APC). Una APC presenta el antígeno a las células efectoras, como linfocitos T y B. La forma en que las APC presentan el antígeno a las células efectoras determina si el sistema inmunológico reacciona con una respuesta inflamatoria o el antígeno es tolerado. La respuesta inflamatoria a un órgano trasplantado se denomina alorespuesta. Una alorespuesta inflamatoria de linfocitos T efectoras mediatiza la ACR, mientras que una alorespuesta inflamatoria de linfocitos B efectoras incluye la maduración en los linfocitos B de memoria segregadores de anticuerpos (también conocidos como células plasmáticas) que median el HR.

20 Con el fin de identificar a los pacientes con alto riesgo de rechazar un trasplante, se realizan previamente pruebas a los candidatos a un trasplante de órganos o cardíaco de anticuerpos anti-HLA contra linfocitos de un grupo de personas representativas de los principales alotipos HLA, que se conocen colectivamente como mediciones del panel de anticuerpos reactivos (PRA). Además de predecir una mayor probabilidad de anticuerpos anti-HLA específicos del donante y el consiguiente riesgo de fracaso precoz del injerto relacionados con el rechazo humoral, varios estudios han demostrado que los niveles elevados de PRA previos al trasplante en receptores de aloinjerto están asociados con resultados adversos después del trasplante, si se compara con pacientes con reactividad baja o negativa. Los niveles altos de PRA se han asociado, en algunos estudios, con una mayor frecuencia de rechazo celular agudo, disminución de la supervivencia del injerto a largo plazo, y un aumento de la mortalidad. Además, la aparición de la enfermedad arterial coronaria (CAD) acelerada en receptores de trasplantes cardíacos, la principal limitación a la supervivencia del injerto a largo plazo, ha sido asociada con la presencia de anticuerpos anti-HLA. Dado que la CAD acelerada en estos pacientes puede ser consecuencia de un cúmulo de episodios de rechazo celular de alto grado, es posible que esta asociación pueda reflejar realmente una relación entre anticuerpos anti HLA y el rechazo celular agudo. Sin embargo, los PRA, y otras pruebas no son altamente sensibles y específicas. Por tanto, sigue siendo necesario disponer de una prueba sensible y específica para el rechazo humoral y celular agudo.

30 <Ashok Kumar et al, Surgery, vol 146, nº 2, 166-173, 2009 y la patente USA 2006/275752A describen la determinación de un índice de inmunoreactividad para la postulación de rechazos en trasplantes.

Resumen de la divulgación

35 La invención se define en las reivindicaciones.

El linfocito B se origina en las células progenitoras de la médula ósea, que progresan a través de varias etapas, como las etapas pro, pre y transicional en el linfocito B naive.

40 El linfocito B tiene muchas funciones. Puede servir como una célula presentadora de antígeno, que activa los linfocitos T citotóxicos hacia la función efectora, puede activar los linfocitos Th1 naive o de memoria, o evolucionar a una célula de memoria de larga duración y transformarse en una célula plasmática secretora de anticuerpos con ayuda del linfocito T y perpetuar las respuestas de anticuerpos a

autoantígenos. El antígeno es detectado por el linfocito B a través del receptor de linfocitos B, o la molécula de inmunoglobulina.

45 El reconocimiento de antígenos, la captación y la presentación son los primeros pasos en las muchas funciones que realiza el linfocito B. Los inventores han desarrollado métodos y ensayos para medir esta función presentadora de antígeno para la detección temprana de actividad o gravedad de una serie de enfermedades inmunológicas producidas por antígenos extraños y de otro tipo. Estos antígenos incluyen, entre otros, tejidos y células y órganos trasplantados,

50 patógenos infecciosos, alérgenos, autoantígenos (antígenos propios, que normalmente no provocan una respuesta inmunitaria) y antígenos tumorales.

De este modo, en el presente documento se describen métodos y ensayos para el diagnóstico y la predicción de la actividad de los linfocitos B, por ejemplo, el rechazo humoral o celular agudo. La monitorización de la captación y presentación de antígenos por las APCs se utiliza para determinar si la respuesta de células efectoras dará como resultado ACR, HR, o una ausencia de las mismas. En varios ejemplos, el ensayo descrito se utiliza para diagnosticar o predecir el rechazo del órgano trasplantado, la enfermedad injerto-contra-huésped (GVHD) o la inmunidad a un antígeno. Por ejemplo, el ensayo se utiliza para diagnosticar o predecir la GVHD después del

trasplante de órganos sólidos, médula ósea, células madre o una combinación de los mismos. En otros ejemplos, el ensayo se utiliza para predecir la inmunidad contra antígenos tumorales, autoantígenos, antígenos de un patógeno o una combinación de los mismos.

5 También se proporciona un método para evaluar el rechazo de órganos que incluye el poner en contacto una primera muestra que incluye APCs obtenida de un sujeto que necesita o ha recibido un trasplante de órgano de un donante, con un antígeno donante del donante, en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno donante, y la medición de la captación del antígeno donante. El método incluye también el poner en contacto una segunda muestra que incluye APCs obtenidas del sujeto que necesita o ha recibido un trasplante de órgano, con un antígeno tercero en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno tercero, y medir la captación del antígeno tercero. A continuación, se determina la relación de captación del antígeno donante en la primera muestra para captar el antígeno tercero en la segunda muestra. Si la captación del antígeno donante supera la captación del antígeno tercero en forma de una relación superior a uno entonces el sujeto experimenta el rechazo del órgano o es probable que lo experimente. La preparación de la APC puede consistir en leucocitos de sangre periférica. Las APC son linfocitos B.

15 En el presente documento se describe también un método para evaluar el rechazo de linfocitos B en un sujeto mediante la determinación de un índice presentador de antígeno (API). El método incluye comparar la captación de las APCs del receptor del antígeno de un donante con la captación de las APCs del receptor de un antígeno tercero. Un API superior a uno predice con una sensibilidad de al menos el 90% y una especificidad de al menos el 90% un aumento del riesgo de rechazo humoral o celular agudo o la presencia de rechazo humoral o celular agudo.

20 También se proporciona el método para evaluar la GVHD en un sujeto. El método incluye evaluar la GVHD poniendo en contacto una primera muestra que incluye APCs del donante obtenidas de una muestra de médula ósea o células madre del donante antes del trasplante o del receptor que ha recibido médula ósea o células madre del donante, con un antígeno receptor de un sujeto del que ha recibido un trasplante de médula ósea o un trasplante de células madre del receptor, en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno receptor y medir la captación del antígeno receptor. El método incluye también poner en contacto una segunda muestra que incluye APCs del donante obtenidas de una muestra de médula ósea o células madre del donante antes del trasplante, del receptor que ha recibido médula ósea o células madre del donante, con un antígeno tercero en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno tercero, y medir la captación del antígeno tercero. A continuación, se determina la relación de la captación del antígeno receptor en la primera muestra con respecto a la captación del antígeno tercero en la segunda muestra. Una relación superior a uno indica que el sujeto tiene, o es probable que desarrolle una GVHD. La preparación de la APC puede consistir en leucocitos de sangre periférica. La preparación de la APC puede consistir de un linfocito B, por ejemplo, un linfocito B del donante.

25 Además se proporcionan métodos para determinar la respuesta de los linfocitos B a otros antígenos, incluyendo antígenos de alérgenos, agentes patógenos infecciosos, tumores o asociados con enfermedades o trastornos autoinmunes. Los patógenos infecciosos incluyen bacterias, hongos, protistas, priones y/o virus. Estos usos adicionales pueden realizarse aisladamente o además de diagnosticar o predecir el rechazo del órgano trasplantado.

35 Las características anteriores y otras adicionales de la divulgación serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de diversas realizaciones que se realizan con referencia a las figuras que acompañan al texto.

Breve descripción de las figuras

40 **La FIG. 1** es una serie de diagramas de dispersión de datos de citometría de flujo que muestran la captación de antígenos en las personas que sufren un rechazo frente a las que no lo sufren. En la persona que sufre un rechazo (paneles superiores), el 23,6% de los linfocitos B del receptor presentan antígeno donante (panel superior central), en comparación con el 4,8% de linfocitos B del receptor que presentan antígeno tercero (panel superior derecho) para un API de 4,91. En la persona que no sufre un rechazo (paneles inferiores), el 35,9% de linfocitos B del receptor presenta antígeno tercero (panel inferior derecho), pero solo el 13,3% presentan antígeno donante (panel central inferior). El API es 0,37 en este sujeto que no ha sufrido un rechazo.

50 **La FIG. 2** es un gráfico del API de 28 niños con trasplante de hígado o intestino en tres momentos diferentes. La mayoría de los que no sufrieron un rechazo (panel inferior) se mantuvo por debajo del umbral de riesgo de rechazo del API < 1,11 en los tres momentos. La mayoría de los que sufrieron un rechazo (líneas negras, panel superior) se encontraban en el umbral de riesgo de rechazo IR de 1,11, o por encima, antes y durante los primeros 1 a 60 días después del trasplante, pero por debajo de este umbral durante el período de 61 a 200 días después del trasplante. Las barras de error representan el error estándar de la media.

55 **La FIG. 3** es un conjunto de gráficos del API de linfocitos B CD19+ obtenido usando leucocitos de sangre periférica (PBL) del donante «real» y del donante «subrogado» representado en un gráfico para 7 niños con trasplante de hígado o intestino. El donante subrogado consta de leucocitos de sangre periférica de sujetos humanos sanos con HLA coincidente con el donante real, y por tanto se asemejan a este donante real. La correlación entre el API obtenido con cualquier estimulador fue significativamente alta para cualquiera de las poblaciones receptoras (panel izquierdo). La asignación del estado de rechazo (R) o no-rechazo (NR) basada en un API del umbral de riesgo de rechazo de $\geq 1,115$ fue la misma con cualquier estimulador para cualquier población receptora (panel derecho).

Descripción detallada de las diversas realizaciones*I. Abreviaturas*

ACR:	rechazo celular agudo
APC:	célula presentadora de antígeno
API:	índice presentador de antígeno
CD:	clúster de diferenciación
HR:	rechazo humoral
LTx:	trasplante de hígado
MLR:	respuesta de linfocitos mixta
OVA:	ovoalbúmina
PBL:	leucocitos de sangre periférica
SBTx:	trasplante de intestino delgado

1. Términos

5 Se facilitan las siguientes explicaciones de términos y métodos para describir mejor la presente divulgación y guiar al experto en la técnica en la práctica de la presente divulgación. Las formas singulares «a», «una» y «el» se refieren a uno o más de uno, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término «compuesto por una molécula de ácido nucleico» incluye una única o varias moléculas de ácido nucleico y se considera equivalente a la frase «compuesto por al menos una molécula de ácido nucleico». El término «o» se refiere a un único elemento de los elementos alternativos indicados o a una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. En el presente documento, «comprende» significa «incluye». Por lo tanto, «compuesto por A o B», significa «incluyendo A, B o A y B», sin excluir elementos adicionales.

10 Salvo que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que suele entender el experto en la técnica al que pertenece esta divulgación. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento pueden ser utilizados en la práctica o prueba de la presente divulgación, y a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

15 **Aloinjerto:** Un trasplante de un órgano, tejido, fluido corporal o célula de un individuo a otro individuo no idéntico genéticamente de la misma especie. En el presente documento, «alogénico» engloba un fenotipo genéticamente diferente presente en sujetos no idénticos de la misma especie. Los ejemplos alogénicos incluyen fenotipos de grupo sanguíneo y alotipos immunoantigenéticos. Un "aloantígeno" abarca cualquier antígeno reconocido por diferentes sujetos de la misma especie. Los organismos, células, tejidos, órganos y similares, o derivados de un solo individuo, o de un individuo genéticamente idéntico son "autólogos." El «rechazo del trasplante» se refiere a una respuesta inmunitaria parcial o completa a un trasplante de células, tejidos, órganos o similares en un receptor del trasplante debido a una respuesta inmunitaria a un injerto alogénico.

20 **Animales:** organismos vertebrados multi-celulares vivos, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término mamífero incluye tanto mamíferos humanos como no humanos. De forma similar, el término «sujeto» incluye tanto sujetos humanos como veterinarios.

25 **Anticuerpo:** un ligando polipéptido que incluye al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada y que se une específicamente a un epítipo de un antígeno. Los anticuerpos pueden incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, o fragmentos de anticuerpos.

30 El término «se une específicamente» se refiere, con respecto a un antígeno, a la asociación preferente de un anticuerpo o de otros ligandos, total o parcialmente, con un polipéptido específico. Un agente de unión específico se une sustancialmente solo a un objetivo definido. Se reconoce que un menor grado de interacción no específica puede ocurrir entre una molécula, como un agente aglutinante específico y un polipéptido no objetivo. Sin embargo, la unión específica se puede distinguir como mediada a través del reconocimiento específico del antígeno. Aunque selectivamente los anticuerpos reactivos unen el antígeno, pueden hacerlo con una afinidad baja. La unión específica generalmente da como resultado un aumento superior a 2 veces, superior a 5 veces, superior a 10 veces, o superior a 100 veces en la cantidad de anticuerpo unido u otro ligando (por unidad de tiempo) a un polipéptido

objetivo, frente a un polipéptido no objetivo. Hay una serie de formatos de inmunoensayo adecuados para seleccionar anticuerpos específicamente

inmunorreactivos con una proteína determinada. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA de fase sólida son habitualmente utilizados para seleccionar anticuerpos monodonaes específicamente inmunorreactivos con una proteína. Ver Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988), para obtener una descripción de los formatos de inmunoensayos y las condiciones que se pueden utilizar para determinar la inmunorreactividad específica.

Los anticuerpos pueden estar compuestos de una cadena pesada y una ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, denominada la región pesada variable (VH) y la región ligera variable (VL). En conjunto, la región VH y la región VL son responsables de unir el antígeno reconocido por el anticuerpo. Esto incluye las inmunoglobulinas intactas y las variantes y porciones de ellas que son bien conocidas en la técnica, como fragmentos Fab', fragmentos F(ab)2,

proteínas Fv de cadena simple («scFv») y proteínas Fv estabilizadas de disulfuro («dsFv»). Una proteína scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de cadena pesada de una inmunoglobulina están unidas por un enlace, mientras que en dsFvs, las cadenas han sido mutadas para introducir un enlace de disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término también incluye formas recombinantes como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (como anticuerpos biespecíficos). Ver también, Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, *Immunology*, 3ª edición, W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Un «anticuerpo monodonal» es un anticuerpo producido por un solo clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de cadena ligera y pesada de un solo anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales son producidos por métodos conocidos para el experto en la técnica, por ejemplo, creando células formadoras de anticuerpos híbridas a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunes del bazo. Estas células fusionadas y su progenie se denominan «hibridomas». Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

En algunos ejemplos, los anticuerpos están marcados, por ejemplo con un marcador fluorescente que puede ayudar a detectarlos.

Antígeno: Un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o la respuesta de linfocitos T en un animal, incluyendo composiciones que son inyectadas o absorbidas en un animal. Un antígeno reacciona con productos de inmunidad celular o humoral específica, incluyendo aquellos inducidos por inmunógenos heterólogos. El término se utiliza indistintamente con el término «inmunogénico». El término «antígeno» incluye todos los epítomos antigénicos relacionados. Un «polipéptido antigénico» es un polipéptido que puede estimular una respuesta inmune, por ejemplo, una respuesta de linfocitos T o una respuesta de anticuerpos. «Epítomo» o «determinante antigénico» se refiere a un punto en un antígeno en el cual los linfocitos B y/o T responden. Los linfocitos T pueden responder al epítomo cuando el epítomo se presenta junto con una molécula MHC. Los epítomos pueden formarse tanto de aminoácidos contiguos (lineales) o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegado terciario de un polipéptido antigénico (conformacionales). Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente son retenidos al exponerse a disolventes de desnaturalización mientras que los epítomos formados por plegado terciario típicamente se pierden en el tratamiento con disolventes de desnaturalización. Normalmente, un epítomo de linfocitos B incluirá al menos 5 aminoácidos pero puede ser tan pequeño como 3-4 aminoácidos. Un epítomo de linfocitos T, como un epítomo CTL, incluirá al menos 7-9 aminoácidos y un epítomo de linfocitos T colaborador al menos 12-20 aminoácidos. Normalmente, un epítomo incluirá entre 5-15 aminoácidos, por ejemplo, 9, 10, 12 o 15 aminoácidos. Los aminoácidos se encuentran en una conformación espacial única. En un ejemplo concreto, el antígeno es un antígeno obtenido de un sujeto que es un donante, por ejemplo, de un órgano o de médula ósea, a otro individuo genéticamente diferente, dicho antígeno se denomina **antígeno donante**. En un ejemplo, el antígeno donante incluye antígenos de linfocitos, leucocitos, como leucocitos de sangre periférica o una combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el antígeno donante induce membranas celulares lisadas de los leucocitos de sangre periférica, células del bazo, o células de la médula ósea del donante. En un ejemplo, el antígeno donante puede ser proporcionado por un sujeto que tenía un perfil de loci HLA-A, HLA-B, o HLA-DR similar al donante. En otros ejemplos, el antígeno es un **antígeno tercero** (también conocido como antígeno de referencia). Un antígeno tercero es un antígeno que no se ha obtenido del donante de órganos o del receptor de órganos y no tiene similitud con el receptor o el donante (como indica la medición de loci HLA-A, HLA-B y HLA-DR). Entre los ejemplos de muestras de antígenos de terceros se incluyen linfocitos, leucocitos, como los leucocitos de sangre periférica o una combinación de los mismos. Por ejemplo, las muestras de antígenos de terceros incluyen membranas de células lisadas de leucocitos de sangre periférica, células del bazo o células de la médula ósea del donante. Un **autoantígeno** es un antígeno que en condiciones normales no sería un objetivo del sistema inmune. Sin embargo, la tolerancia inmunológica normal para ese antígeno se pierde en un sujeto que padece una enfermedad autoinmune específica y estimula la producción de autoanticuerpos.

Células presentadoras de antígeno (APCs): células altamente especializadas que pueden procesar antígenos y mostrar sus fragmentos de péptidos en la superficie celular junto con moléculas necesarias para la activación de linfocitos. Por ejemplo, una APC es una célula que puede presentar antígeno unido a moléculas MHC de clase I o

clase II para linfocitos T. Las APCs incluyen, entre otras, monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T y células de Langerhans. Un linfocito T que puede presentar antígeno a otros linfocitos T (incluyendo CD4+ y/o CD8+ linfocitos T) es un linfocito T presentador de antígeno (T-APC).

5 **Índice presentador de antígeno (API):** Una medida de la captación (por unión o internalización) del antígeno donante en APCs de un sujeto, expresada como una relación con la captación del antígeno tercero en APCs del sujeto. Un API > 1 indica un mayor riesgo de rechazo o presencia de rechazo en el sujeto. Un API < 1 indica un menor riesgo de rechazo o ausencia de rechazo en un sujeto. El API normaliza la captación de antígenos del donante para la captación de un antígeno de referencia (de terceros) para cada persona. El API es único para cada individuo, pero comparable entre individuos.

10 **Linfocito B:** uno de los dos tipos principales de linfocitos. Los linfocitos B se derivan de células progenitoras de la médula ósea, que progresan a través de varias etapas, como las etapas pro, pre y transicional en el linfocito B naive. El receptor de antígenos en los linfocitos B es una molécula de inmunoglobulina de superficie celular. Tras la activación por un antígeno, los linfocitos B se diferencian en células productoras de anticuerpos de la misma especificidad que su receptor inicial. Los linfocitos B también son APCs.

15 Un «linfocito B inmaduro» es una célula que puede convertirse en un linfocito B maduro.

Generalmente, los linfocitos pro-B (que expresan, por ejemplo, CD10), realizan una reorganización de la cadena pesada de inmunoglobulina para convertirse en linfocitos pro B pre B y, además, reorganizan la restructuración de la cadena ligera de inmunoglobulina para convertirse en linfocitos B inmaduros.

20 Los linfocitos B inmaduros incluyen linfocitos B T1 y T2. Por tanto, un ejemplo de un linfocito B inmaduro es un linfocito B T1 que es una célula AA41^{alta}CD23^{baja}. Otro ejemplo de un linfocito B inmaduro es un linfocito T2 B que es una célula AA41^{alta}CD23^{alta}. Por tanto, los linfocitos B inmaduros incluyen células de expresión B220 donde los genes de inmunoglobulinas de cadena ligera y pesada se reorganizan, y expresan AA41. Los linfocitos B inmaduros pueden convertirse en linfocitos B maduros, que pueden producir inmunoglobulinas (por ejemplo, IgA, IgG o IgM). Los linfocitos B maduros expresan marcadores característicos como CD21 y CD23 (células CD23^{alta}CD21^{baja}), pero no expresan AA41. En algunos ejemplos, un linfocito B es el que expresa CD179^{alta}, CD24, CD38 o una combinación de los mismos. Los linfocitos B pueden activarse mediante agentes como lipopolisacáridos (LPS) o IL-4 y anticuerpos para IgM.

30 Los linfocitos B tienen muchas funciones. Por ejemplo, un linfocito B puede servir como una APC (que activa los linfocitos T citotóxicos a la función efectora), activar los linfocitos Th1 naive o de memoria o evolucionar a una célula de memoria longeva y transformarse en una célula plasmática secretora de anticuerpos con ayuda del linfocito T, y perpetuar las respuestas de anticuerpos a autoantígenos. El antígeno es detectado por el linfocito B a través del receptor de linfocitos B o la molécula de inmunoglobulina.

CD5: Un marcador de linfocitos B, también conocido como «clúster de diferenciación 5».

35 Los linfocitos B CD5⁺ son una clase de linfocitos B atípicos, auto-renovables que se encuentran principalmente en las cavidades pleurales y peritoneales en adultos y que tienen un repertorio en el receptor mucho menos diverso que los linfocitos B convencionales.

40 **CD10:** Un marcador de linfocitos B. CD 10 se expresa principalmente en los primeros linfocitos B y en los blastos de linfocitos B, así como los precursores de linfocitos T y las células estromales de la médula ósea. CD10 es un antígeno, que es un marcador de superficie celular utilizado en el diagnóstico de la leucemia linfocítica aguda humana (ALL). CD 10 también se conoce como membrana metalo- endopeptidasa (MME) y CALLA.

45 **CD27:** Una proteína expresada en timocitos medulares, linfocitos T, células asesinas naturales (NK) y algunos linfocitos B. CD27 es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF. Este receptor está implicado en la generación y el mantenimiento a largo plazo de la inmunidad del linfocito T. Se une al ligando CD70, y desempeña un papel importante en la regulación de la activación del linfocito B y la síntesis de inmunoglobulina. CD27 transduce señales que llevan a la activación de NF-κB y MAPK8/JNK.

CD154: Una proteína expresada en linfocitos T. CD 154 también se conoce como ligando CD40. CD 154 regula la función del linfocito B conectando CD40 en la superficie del linfocito B. Un defecto en este gen produce la incapacidad para realizar la conmutación de las clases de inmunoglobulinas y se asocia con el síndrome de hiper-IgM.

50 **Contacto:** Colocación en asociación física directa; incluye la forma sólida y líquida.

55 **Diagnóstico:** El proceso de identificar una enfermedad por sus señales, síntomas y los resultados de distintas pruebas. La conclusión a la que se llega a través de ese proceso también se denomina «un diagnóstico». Los métodos de diagnóstico realizados habitualmente incluyen análisis de sangre, diagnóstico médico por la imagen, análisis genéticos, análisis de marcadores moleculares, análisis de orina, biopsia e histología. Los métodos de diagnóstico difieren en su **sensibilidad** y **especificidad**. La «sensibilidad» de un ensayo diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos (por ejemplo, aquellos que desarrollen un rechazo del órgano trasplantado) que den positivo (porcentaje de verdaderos positivos). La «especificidad» de un ensayo diagnóstico es 1 menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de falsos positivos se define como la proporción de sujetos sin la enfermedad que dan

positivo. Aunque un método de diagnóstico determinado no puede proporcionar un diagnóstico definitivo de un estado, es efectivo si el método proporciona una indicación positiva que ayuda en el diagnóstico. «Pronóstico» es la probabilidad de desarrollo (o, por ejemplo, la probabilidad de gravedad) de un estado patológico, por ejemplo, el rechazo de órganos.

- 5 **Fluoróforo:** un compuesto químico, que cuando se estimula por exposición a un estímulo determinado, como una longitud de onda de luz definida, emite luz (fluorescencia), por ejemplo, a una longitud de onda diferente (como una mayor longitud de onda de luz).

Los fluoróforos forman parte de una clase más amplia de compuestos luminiscentes.

- 10 Los compuestos luminiscentes incluyen moléculas quimioluminiscentes, que no requieren una determinada longitud de onda de luz para emitir luz, sino que utilizan una fuente de energía química. Por tanto, el uso de moléculas quimioluminiscentes (como aequorina) puede eliminar la necesidad de una fuente externa de radiación electromagnética, como un láser.

- 15 Ejemplos de fluoróforos particulares que se pueden utilizar en los métodos divulgados se proporcionan en la Patente USA N° 5.866.366 concedida a Nazarenko *et al.*, por ejemplo, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilben-2,2'-disulfónico, acridina y derivados como acridina y isotiocianato de acridina, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftalen-1-sulfónico (EDANS), 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5 disulfonato (Lucifer Yellow VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, Amarillo brillante, cumarina y derivados como cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Coumaran 151); cianosina; 4',6-diamino-2-fenilindol (DAP); 5', 5"-dibromopirogalol- sulfonftaleína (rojo de bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'- 25 isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietilentriamina; 4,4-

- ácido diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno- 2,2'-disulfónico; 5-[dimetilamino]naftaleno-1-cloruro de sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados como eosina e isotiocianato de eosina; eritrosina y derivados como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2ilo)aminofluoresceína (DTAF), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), y QFITC (XRITC); fluorescamina; IR144; IR1446; isotiocianato de malaquita verde; 4-metilumbelliferona; orto cresolfaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Rojo fenol; B-ficoeritrina; oftaldialdehído; pireno y derivados como pireno, butirato de pireno y succinimidilo 1-butilato de pireno; rojo reactivo 4 (Rojo brillante 3B-A Cibacron™); rodamina y derivados como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-rodamina (R6G), cloruro de sulfonilo de lisamina rodamina B, rodamina (Rod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulforodamina B, sulforodamina 101 y cloruro de sulfonilo derivado de sulforodamina 101 (Rejo Texas); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA); tetrametil rodamina; isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); riboflavina; ácido rosólico y derivados de quelato de terbio; rojo de LightCycler 640; Cy5,5; y Cy56-carboxifluoresceína; 5-carboxifluoresceína (5-FAM); difluorido dipirrometeno de boro (BODIPY); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA); acridina, estilbeno, -6-carboxi-fluoresceína (HEX), TET (Tetrametil fluoresceína), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), Rojo Texas, 2',7'-dimetoxi-4',5'- didoro-6-carboxifluoresceína (JOE), Cy3, Cy5, VIC® (Applied Biosystems), Rojo LC 640, Rojo LC 705, amarillo Yakima entre otros.

- 35 Otros fluoróforos adecuados incluyen aquellos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo los comercializados por Molecular Probes (Eugene, Oregón). En ejemplos específicos, un fluoróforo es carbosifluorescensucinimildiester.

Enfermedad de injerto contra huésped (GVHD): Una complicación común y grave de médula ósea u otro trasplante de tejido en donde hay una reacción de linfocitos inmunológicamente competentes donados contra el propio tejido del receptor del trasplante.

- 40 La GVHD es una posible complicación de cualquier trasplante que utiliza o que contiene células madre de un donante emparentado o no emparentado.

- Hay dos tipos de GVHD aguda y crónica. La GVHD aguda aparece durante los tres primeros meses después de que se haya realizado el trasplante. Los signos de GVHD aguda incluyen una erupción cutánea rojiza en las manos y en los pies, que puede propagarse y volverse más grave y presentar descamación o ampollas en la piel. La GVHD aguda también puede afectar al estómago e intestinos, en cuyo caso se producen cólicos, náuseas y diarrea. La coloración amarillenta de la piel y los ojos (ictericia) indica que la GVHD aguda ha afectado el hígado. La GVHD crónica se clasifica según su gravedad: la fase/grado 1 es leve; la fase/grado 4 es grave. La GVHD crónica se desarrolla una vez han pasado tres meses o más después del trasplante. Los síntomas de la GVHD crónica son similares a los de la GVHD aguda, pero además, la GVHD crónica también puede afectar las glándulas mucosas de los ojos, las glándulas salivares de la boca y las glándulas que lubrican el revestimiento del estómago e intestinos.

- 55 **IgA:** Un isotipo de anticuerpo que desempeña un papel crucial en la inmunidad de la mucosa. Se produce más IgA en los revestimientos de la mucosa que en todos los otros tipos de anticuerpos combinados. Hay dos subclases de IgA (IgA1 e IgA2) y puede existir en una forma dimérica denominada IgA secretora (sIgA). En su forma secretora, IgA es la principal inmunoglobulina que se encuentra en secreciones mucosas, incluyendo las lágrimas, la saliva, el calostro y secreciones del tracto genito-urinario, el tracto gastrointestinal, la próstata y el epitelio respiratorio.

También se encuentra en pequeñas cantidades en la sangre. El componente secretorio de sIgA protege la inmunoglobulina de que se degrade por las enzimas proteolíticas, por tanto, la sIgA puede sobrevivir en el difícil entorno del tracto gastrointestinal y proporcionar protección contra los microbios que se multiplican en las secreciones corporales.

5 **IgD:** Un isotipo de anticuerpo que representa alrededor del 1% de proteínas en las membranas plasmáticas de linfocitos B inmaduros donde a menudo se expresa conjuntamente con otro anticuerpo de superficie celular llamado IgM. IgD también se produce en forma de secreción que se encuentra en muy pequeñas cantidades en el suero sanguíneo. El IgD segregado se produce como un anticuerpo monomérico con dos cadenas pesadas de la clase delta (δ) y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina.

10 **IgM:** Un isotipo de anticuerpo que está presente en los linfocitos B. IgM es el tipo más grande de molécula de anticuerpo en el sistema circulatorio humano. Se produce después de que un animal ha sido expuesto a un antígeno durante un período de tiempo prolongado o cuando un animal se expone a un antígeno por segunda vez.

Respuesta inmunitaria: una respuesta de una célula del sistema inmunológico, por ejemplo, un linfocito B o un linfocito T, a un estímulo. En una realización, la respuesta es específica para un antígeno particular (una «respuesta específica para el antígeno»).

15 Un «parámetro de una respuesta inmune» es cualquier aspecto mensurable específico de una respuesta inmunitaria, incluyendo sin limitación, a la secreción de citocinas (IL-6, IL-10, IFN- γ , etc.), la producción de inmunoglobulinas, la maduración de las células dendríticas, y la proliferación de una célula del sistema inmunológico. El experto en la técnica puede determinar fácilmente un aumento en cualquiera de estos parámetros, utilizando ensayos de laboratorio conocidos. En un ejemplo específico no limitativo, para evaluar la proliferación celular, se puede evaluar la incorporación de ^3H -timidina. Un aumento «sustancial» en un parámetro de la respuesta inmunitaria es un aumento significativo de este parámetro en comparación con un control.

20 Ejemplos específicos no limitativos de un aumento sustancial son, al menos, un aumento de aproximadamente el 50%, al menos un aumento de aproximadamente el 75%, al menos un aumento de aproximadamente el 90%, al menos un aumento de aproximadamente el 100%, al menos un aumento de aproximadamente el 200%, al menos un aumento de aproximadamente el 300%, y al menos un aumento de aproximadamente el 500%. De forma similar, la inhibición o disminución de un parámetro de la respuesta inmunitaria es una disminución significativa de este parámetro en comparación con un control. Ejemplos específicos, no limitativos de una disminución sustancial son al menos una disminución de aproximadamente el 50%, al menos una disminución de aproximadamente el 75%, al menos una disminución de aproximadamente el 90%, al menos una disminución de aproximadamente el 100%, al menos una disminución de aproximadamente el 200%, al menos una disminución de aproximadamente el 300%, y al menos una disminución de aproximadamente el 500%. Se puede utilizar una prueba estadística, por ejemplo, una ANOVA no paramétrica para comparar las diferencias en la magnitud de la respuesta inducida por un agente en comparación con el porcentaje de muestras que responden utilizando un segundo agente. En algunos ejemplos, $p \leq 0,05$ es significativo, e indica un aumento o disminución sustancial en el parámetro de la respuesta inmune. El experto en la técnica puede fácilmente identificar otros ensayos estadísticos de uso.

35 **Sujeto con inmunidad comprometida:** Un sujeto que es incapaz de desarrollar o que es improbable que desarrolle una respuesta inmunitaria firme, generalmente como resultado de una enfermedad, desnutrición, o terapia inmunosupresora. Un sistema inmunológico con inmunidad comprometida es un sistema inmunológico que funciona por debajo de lo normal.

40 Los sujetos con inmunidad comprometida son más susceptibles a infecciones oportunistas, por ejemplo, infecciones por virus, hongos, protozoos, o infecciones bacterianas, enfermedades priónicas, y determinados tumores. Entre quienes se puede considerar con inmunidad comprometida se incluyen, entre otros, los sujetos con SIDA (o seropositivos), sujetos con inmunodeficiencia severa combinada (SCID), diabéticos, sujetos que han sufrido trasplantes y que estén tomando inmunosupresores, y aquellos que están recibiendo quimioterapia para el cáncer. Los individuos con inmunidad comprometida también incluyen sujetos con la mayoría de tipos de cáncer (a excepción del cáncer de piel), anemia de células falciformes, fibrosis quística, aquellos que no tienen bazo, sujetos con enfermedad renal en estado terminal (diálisis), y aquellos que han estado tomando corticoides de forma habitual en pastillas o mediante inyecciones durante el último año. Los sujetos con problemas graves de hígado, pulmón o enfermedad cardíaca también pueden presentar la inmunidad comprometida.

50 **Enfermedad infecciosa:** Cualquier enfermedad producida por un agente infeccioso. Ejemplos de patógenos infecciosos incluyen, aunque sin limitación: virus, bacterias, micoplasma y hongos. En un ejemplo específico, es una enfermedad causada por al menos un tipo de patógeno infeccioso. En otro ejemplo, es una enfermedad causada por al menos dos tipos diferentes de patógenos infecciosos. Las enfermedades infecciosas pueden afectar a cualquier sistema del cuerpo, ser agudas (duración breve) o crónica y persistente (duración prolongada), ocurren con o sin fiebre, atacan a cualquier grupo de edad, y se superponen entre sí. Las enfermedades infecciosas pueden ser infecciones oportunistas, al producirse más frecuentemente en sujetos con inmunidad comprometida.

55 Las enfermedades virales ocurren comúnmente después de la inmunosupresión debido a la reactivación de los virus presentes en el receptor. Ejemplos específicos de infecciones virales incluyen, entre otros, retinitis, enteritis y neumonía por citomegalovirus (CMV); enfermedad linfoproliferativa por virus Epstein-Barr (EBV); varicela/herpes

(causada por el virus varicela zoster, VZV); mucositis HSV-1 y -2; encefalitis HSV-6, cistitis hemorrágica de virus BK; gripe viral; neumonía por virus respiratorio sincitial (RSV) SIDA (producido por VIH); y hepatitis A, B o C.

Las infecciones oportunistas se producen en un sujeto con el sistema inmunológico comprometido, como un sujeto que ha sido inmunodeprimido y ha recibido recientemente un trasplante de médula ósea o un trasplante de células madre hematopoyéticas. Estas infecciones incluyen, aunque sin limitación, citomegalovirus, *Candida albicans*, virus de inmunodeficiencia humana, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomas aeruginosa* *Acinteobacter baumannii*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystitis carinii*, o infecciones por *Aspergillus*.

Otros ejemplos de virus infecciosos incluyen: *Retroviridae*; *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la poliomielitis, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus de Coxsackie humano, rinovirus, echovirus); *Caliciviridae* (como cepas que producen gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola; *Flaviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus del Ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus de la parainfluenza, virus de las paperas, sarampión, virus respiratorio sincitial); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Bungaviridae* (por ejemplo, virus, Hantaan, virus bunga, flebovirus y nairovirus); *Arena viridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Bimaviridae*; *Hepadnaviridae* *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del Papilloma, poliomavirus); *Adenoviridae* (la mayoría de adenovirus); *Herpesviridae* (virus herpes simple (HSV) 1 y HSV-2, virus varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus herpes); *Poxviridae* (virus de la viruela, virus de la vacuna de la viruela, virus de la viruela); e *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, agentes etiológicos de la encefalopatía espongiiforme, agente de la hepatitis delta (se cree que fue un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), agentes de hepatitis no-A y no-B (clase 1 = transmitida internamente; clase 2 = transmisión parenteral (es decir, hepatitis C); virus Norwalk y afines, y astrovirus).

Los ejemplos de infecciones micóticas incluyen, entre otras: aspergilosis; aftas (producidas por *Candida albicans*), criptococosis (producida por *Cripto coccus*), e histoplasmosis. Por lo tanto, los ejemplos de hongos infecciosos incluyen, entre otros, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*.

Los ejemplos de bacterias infecciosas incluyen: *Helicobacter pylori*, *Borelia Burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *micobacterias* *sps* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus del grupo A*), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus del grupo B*) *Streptococcus (grupo viridans)*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus (anaerobico sps.)*, *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter patógeno sp.*, *Entereocococ sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *corynebacterium diphtheriae*, *corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringers*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, y *Actinomyces israelii*. Otros organismos infecciosos (como protistas) incluyen: *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*.

Aislado: Un componente biológico «aislado» (por ejemplo, ácido nucleico, péptido o proteína) ha sido sustancialmente separado, producido aparte, o purificado lejos de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el cual el componente se produce naturalmente, es decir, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos y proteínas. Ácidos nucleicos, péptidos y proteínas que han sido «aislados», por lo que incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificadas por métodos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos, péptidos y proteínas preparados por expresión recombinante en una célula huésped así como los ácidos nucleicos sintetizados químicamente. Del mismo modo, una célula «aislada» ha sido sustancialmente separada, producida aparte o purificada lejos de otras células del organismo en el que la célula se produce naturalmente. Las células aisladas pueden ser, por ejemplo, al menos un 99%, al menos un 98%, al menos un 95%, al menos un 90%, al menos un 85%, o al menos un 80% puras.

Etiqueta: Un agente con capacidad para la detección, por ejemplo, mediante ELISA, espectrofotometría, espectrometría de masas, citometría de flujo o microscopía. Por ejemplo, una etiqueta que se pueda adherir a una molécula y permita la detección de la molécula. En un ejemplo determinado, se adhiere una etiqueta a un anticuerpo. Entre los ejemplos de etiquetas se incluyen, entre otras, isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, cofactores, ligandos, agentes quimioluminescentes, fluoróforos, haptenos, enzimas, metales, isótopos metálicos y combinaciones de los mismos. Los métodos de etiquetado y guía en la elección de las etiquetas apropiadas para los distintos propósitos se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) y Ausubel *et al.* (en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1998). En un ejemplo específico, los antígenos donante y tercero están etiquetados con un fluoróforo, por ejemplo, carboxifluoresceína succinimildiester para permitir la detección del antígeno por citometría de flujo.

Leucocito: Las células en la sangre, también llamadas «glóbulos blancos», que intervienen en la defensa del cuerpo ante organismos infecciosos y sustancias extrañas.

Los leucocitos se producen en la médula ósea. Hay 5 tipos principales de glóbulos blancos, subdivididos entre 2 grupos principales: leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y leucocitos mononucleares (monocitos y linfocitos).

Linfocitos: Un tipo de glóbulos blancos que intervienen en las defensas del sistema inmunitario del cuerpo. Los tipos principales de linfocitos son: linfocitos B, linfocitos T y células asesinas naturales (células NK). Los «linfocitos T» o «células T» son linfocitos que no producen anticuerpos que constituyen una parte del sistema inmunitario que actúa mediado por células. Los linfocitos T se derivan de linfocitos inmaduros que migran desde la médula ósea al timo, donde sufren un proceso de maduración, bajo la dirección de hormonas tímicas. Aquí, los linfocitos maduros se dividen rápidamente aumentando en cantidades muy grandes. La maduración de linfocitos T se convierte en inmunocompetente en base a su capacidad para reconocer y unirse a un antígeno específico. La activación de los linfocitos T inmunocompetentes se desencadena cuando un antígeno se une a los receptores de la superficie de los linfocitos. Los linfocitos T incluyen, entre otros, linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺. Un recuento de linfocitos T CD4⁺ es una célula inmunitaria que lleva un marcador en su superficie, conocido como «clúster de diferenciación 4» (CD4). Estas células, también conocidas como linfocitos T colaboradores, ayudan a organizar la respuesta inmunitaria, incluyendo las respuestas de anticuerpos, así como las respuestas de los linfocitos T asesinos. Los linfocitos T CD8⁺ llevan el marcador «clúster de diferenciación 8» (CD8).

En una realización, un linfocito T CD8 es un linfocito T citotóxico. En otra realización, un linfocito CD8 es un linfocito T supresor.

Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC): Una denominación genérica que pretende abarcar los sistemas de antígenos de histocompatibilidad descritos en diferentes especies, incluyendo los antígenos leucocitarios humanos («HLA»).

Rechazo de órganos o rechazo del trasplante: deterioro funcional y estructural de un órgano debido a una respuesta inmunitaria activa expresada por el receptor, e independiente de causas no inmunológicas de la disfunción orgánica.

Muestra (o muestra biológica): una muestra biológica que contiene ADN, ARN genómico (incluyendo ARNm y microARN), proteínas, células, tejidos o combinaciones de los mismos, que se obtiene de un sujeto. Los ejemplos incluyen, entre otros, sangre periférica, orina, saliva, tejido de biopsia, muestras de aspiración con aguja fina, especímenes quirúrgicos y material de autopsia. En un ejemplo, una muestra es una muestra de sangre que incluye linfocitos, leucocitos, por ejemplo, leucocitos de sangre periférica, o una combinación de los mismos, con o sin eritrocitos.

Sujeto: organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye mamíferos humanos y no humanos. En un ejemplo determinado, el sujeto es un niño. En el presente documento, un «niño» se refiere a una persona que tiene menos de 18 años.

Linfocito T: un glóbulo blanco crítico en la respuesta inmunitaria. Los linfocitos T incluyen, aunque sin limitación, linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺. Un linfocito T CD4⁺ es una célula inmunitaria que lleva un marcador en su superficie, conocido como «clúster de diferenciación 4» (CD4). Estas células, también conocidas como linfocitos T colaboradores, ayudan a organizar la respuesta inmunitaria, incluyendo las respuestas de anticuerpos así como las respuestas de los linfocitos T asesinos. Los linfocitos T CD8⁺ llevan el marcador «clúster de diferenciación 8» (CD8). En una realización, un linfocito T CD8 es un linfocito T citotóxico. En otra realización, un linfocito CD8 es un linfocito T supresor.

Agente terapéutico: Un compuesto químico, pequeña molécula, u otra composición, como un compuesto antisentido, anticuerpo, inhibidor de la proteasa, hormona, quimioterapia, citocina, agente radiactivo, o agente antiinflamatorio, que puede inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra adecuadamente a un sujeto.

Cantidad terapéutica efectiva: La cantidad de un determinado agente terapéutico o farmacéutico suficiente para lograr el efecto deseado en el sujeto o una célula tratados con el agente. La cantidad efectiva del agente dependerá de varios factores, incluyendo sin limitación, al sujeto o a las células tratadas, y la forma de administración de la composición terapéutica.

En condiciones suficientes para: Una frase que se utiliza para describir cualquier entomo que permita la actividad deseada. En un ejemplo, incluye **condiciones suficientes para inducir la captación** de una molécula, por ejemplo, la unión o la internalización de un antígeno por una célula (por ejemplo, la unión y/o la internalización del antígeno donante por una APC).

2. Métodos para diagnosticar o predecir el rechazo del órgano trasplantado o GVHD

En el presente documento se describe un ensayo para el diagnóstico y la predicción del rechazo de linfocitos B, como el rechazo al trasplante o GVHD. Este ensayo se basa en el hecho de que un linfocito B es una potente APC. La monitorización de la captación y presentación del antígeno por las APCs sirve como un aviso previo de si la respuesta efectora favorece el ACR o HR, o un estado libre de rechazo. La prueba de presentación de antígeno de linfocitos B que se describe tiene varios usos en los trasplantes. En algunos ejemplos, el ensayo se utiliza para medir el riesgo de rechazo para administrar la terapia con medicamentos anti-rechazo. En algunos ejemplos, el ensayo se utiliza para calcular el tiempo de reducción de riesgo de rechazo o API < 1 al estimar el tiempo de reducción de fármacos inmunosupresores, incluyendo sin limitación, esteroides, tacrolimus, etc., o comparar dos regímenes de fármacos anti-rechazo diferentes, o dos tipos diferentes de receptores de trasplante. En algunos ejemplos, el ensayo

se utiliza para estimar la gravedad del rechazo. Por ejemplo, el API es mayor con un rechazo de mayor gravedad que requiere una terapia de medicamentos anti-rechazo más intensiva. En algunos ejemplos, el ensayo descrito se utiliza para estimar la probabilidad de pérdida del injerto. En algunos ejemplos, el ensayo descrito se utiliza para establecer una estimación del riesgo de rechazo personalizada en cualquier momento de un receptor individual en el que se utiliza el mismo estimulador del donante o del donante subrogado, y se utiliza el mismo antígeno tercero como referencia para la presentación del antígeno donante para el mismo receptor del trasplante. En algunos ejemplos, el ensayo descrito se utiliza en combinación con varios marcadores, que son únicos para las diferentes etapas del desarrollo de linfocitos B, la presentación de antígenos de linfocitos B se puede utilizar para determinar cuándo los linfocitos B naive han transicionado a B IgG+ de memoria. Esta transición de linfocitos B IgG+ de naive a memoria se caracteriza por la disminución o pérdida de la función de presentación de antígenos. Para esta función, se pueden utilizar varios marcadores específicos de linaje de linfocitos B.

En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En ejemplos específicos, el sujeto es un niño humano, por ejemplo, un niño de 0 a 5 años, menos de 10 años, menos de 13 años, o menos de 18 años. En otras realizaciones, el sujeto es un adulto, por ejemplo, un sujeto mayor de 18 años, mayor de 20 años o mayor de 25 años. En otras realizaciones, el sujeto es un animal no humano, tal como un sujeto veterinario (por ejemplo, un animal doméstico pequeño o grande).

El ensayo descrito en el presente documento tiene una sensibilidad y especificidad significativamente mayor que los ensayos descritos previamente. Por ejemplo, estudios previos han evaluado los linfocitos B y otras funciones de las APC incubando las APCs con un antígeno no específico, ovoalbúmina (OVA) en el que se utilizó la captación de OVA como una medida de la presentación del antígeno. La sensibilidad y especificidad de la OVA de linfocitos B fue de un 70-75% para la asociación con el estado propenso al rechazo (persona que sufre el rechazo). Sin embargo, para la aplicación clínica, se necesita una prueba más sensible y específica.

En algunos ejemplos, se describe un método para evaluar el rechazo de órganos. Se contempla la posibilidad de que el trasplante puede ser de cualquier órgano, incluyendo órganos sólidos. En algunos ejemplos, el sujeto ha recibido el trasplante. En algunos ejemplos, el sujeto es un candidato a recibir el trasplante. Ejemplos de órganos sólidos incluyen, entre otros, el hígado, el intestino, el riñón, el corazón, el pulmón, el páncreas y la piel. En el contexto de la presente divulgación, un órgano trasplantado no necesita ser todo el órgano, puede ser una parte o sección del órgano. En ejemplos específicos, el sujeto ha recibido, o necesita recibir varios órganos o partes de varios órganos. En algunos casos, el sujeto es un receptor del trasplante o un candidato a un trasplante de una combinación de dos o más de un órgano sólido, médula ósea y células madre. En algunos casos, el sujeto está siendo objeto de tratamiento, incluyendo terapia inmunosupresora.

En algunos ejemplos, el método incluye poner en contacto una primera muestra compuesta con las APCs obtenida de un sujeto que necesita o que ha recibido un trasplante de órganos de un donante, con un antígeno donante del donante, en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno donante; poner en contacto una segunda muestra de las APCs obtenidas del sujeto que necesita o ha recibido un trasplante de órganos, con un antígeno tercero, en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno tercero; y determinar la relación de la captación del antígeno donante en la primera muestra con la captación del antígeno tercero en la segunda muestra. Una relación superior a uno indica el rechazo del órgano en el sujeto o una predisposición al rechazo de órganos. Las APC son linfocitos B.

En algunas realizaciones, los métodos son para evaluar el rechazo de un trasplante de órganos sólidos. Estos ensayos miden la captación de antígeno donante y la expresan como una relación con la captación del antígeno tercero en las APCs, por ejemplo, como linfocitos B. Esta relación es el API. Un API > 1 indica un mayor riesgo de rechazo o de presencia de rechazo.

Por ejemplo, un API superior a 1,2, superior a 1,5, superior a 1,75, superior a 2, superior a 3, superior a 4, superior a 5, superior a 6, superior a 7, superior a 8, superior a 9, o superior a 10, como, por ejemplo, entre 1,2 y 10, 5 y 10, 1,2 y 3, 1,5 y 2,5, incluyendo 1,25, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 o más puede indicar un mayor riesgo de rechazo. Un API < 1 indica un menor riesgo de rechazo o el rechazo. Por ejemplo, un API inferior a 0,9, inferior a 0,8, inferior a 0,75, inferior a 0,6, inferior a 0,5, inferior a 0,1 o inferior a 0,01, por ejemplo, entre 0,2 y 0,9, 0,3 y 0,8, 0,4 y 0,7, 0,5 y 0,6, incluyendo 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,60, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 puede indicar un menor riesgo de rechazo. El API es único en el sentido de que «normaliza» la captación de antígeno donante para la captación de un antígeno de referencia (tercero) para cada persona. De esta forma, el API es único para cada individuo y, sin embargo, se puede comparar entre individuos sobre la base de esta escala normalizada.

En este documento se proporciona también un método de evaluar la GVHD. En algunos ejemplos, el método incluye poner en contacto una primera muestra que contiene las APCs obtenidas de una muestra de donante de médula ósea o células madre antes del trasplante, o del receptor que ha recibido médula ósea o células madre del donante. El método incluye poner en contacto las APCs del sujeto tras el trasplante, con un antígeno receptor del receptor, en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno receptor; poner en contacto una segunda muestra que contiene las APCs obtenidas de una muestra de médula ósea o células madre del donante antes del trasplante, o del receptor que ha recibido médula ósea o células madre del donante, con un antígeno tercero, en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno tercero; y determinar la relación de captación del antígeno receptor

en la primera muestra de captación del antígeno tercero en la segunda muestra. Una proporción mayor de uno indica GVHD en el sujeto o una predisposición para la GVHD. Las APCs son linfocitos B.

En algunas realizaciones, los métodos para evaluar la GVHD incluyen la medición de la captación del antígeno receptor y expresarla como una relación con la captación del antígeno tercero en los linfocitos B para determinar el API. Un API > 1 indica un mayor riesgo de GVHD o la presencia de GVHD. Por ejemplo, y un API superior a 1,2, superior a 1,5, superior a 1,75, superior a 2, superior a 3, superior a 4, superior a 5, superior a 6, superior a 7, superior a 8, superior a 9, o superior a 10, por ejemplo, entre 1,2 y 10, 5 y 10, 1,2 y 3, 1,5 y 2,5, incluyendo 1,25, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 o más puede indicar un mayor riesgo de GVHD. Un API < 1 indica un menor riesgo de GVHD o GVHD. Por ejemplo, un API inferior a 0,9, inferior a 0,75, inferior a 0,5, inferior a 0,1 o inferior a 0,01, por ejemplo, entre 0,2 y 0,9, 0,3 y 0,8, 0,4 y 0,7, 0,5 y 0,6, incluyendo 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,60, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95 puede...

En algunos ejemplos, los ensayos descritos predicen el rechazo de linfocitos B con una sensibilidad de al menos un 90% y una especificidad de al menos un 90% para un aumento del riesgo de rechazo de linfocitos B o de la presencia de rechazo de linfocitos B. En algunos ejemplos, los métodos que se describen en el presente documento tienen una sensibilidad de al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%, incluido entre el 90% al 98%, entre el 92% al 96%, entre el 92% al 95%, entre el 93% y el 95%, entre el 94% y el 96%, incluyendo el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. En algunos ejemplos, los métodos que se describen en el presente documento tienen una especificidad de al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%, incluido entre el 90% al 98%, entre el 92% al 96%, entre el 92% al 95%, entre el 93% y el 95%, entre el 94% y el 96%, incluyendo el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o el 99%.

En algunas realizaciones del método, un API superior a uno predice el rechazo con una sensibilidad de aproximadamente el 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% y/o una especificidad de aproximadamente el 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99%.

En algunas realizaciones, comparar la captación del donante (o antígeno receptor) con la captación del antígeno tercero incluye, además, el etiquetado de una muestra biológica que se compone de antígeno donante (o receptor) y una muestra biológica que se compone de antígeno tercero con una etiqueta de antígenos detectables. Se puede utilizar cualquier tipo de etiqueta detectable para facilitar la detección. Entre los ejemplos específicos, no limitativos de etiquetas se incluyen etiquetas fluorescentes, enzimas e isótopos radiactivos. Los fluoróforos forman parte de una clase más amplia de compuestos luminiscentes. Los compuestos luminiscentes incluyen moléculas quimioluminiscentes, que no requieren una determinada longitud de onda de luz para emitir luz, sino que utilizan una fuente de energía química. Por tanto, el uso de moléculas quimioluminiscentes (como aequorina) puede eliminar la necesidad de una fuente externa de radiación electromagnética, como un láser.

Ejemplos de fluoróforos específicos que se pueden utilizar en los métodos divulgados en el presente documento se proporcionan en la Patente USA N° 5.866.366 concedida a *Nazarenko et al* por ejemplo, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilben-2,2' disulfónico, acridina y derivados como acridina y isotiocianato de acridina, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftalen-1-sulfónico (EDANS), 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5 disulfonato (Lucifer Yellow VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, Amarillo brillante, cumarina y derivados como cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Cumarina 151); cianosina; 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI); 5', 5"-dibromopirogalol- sulfonftaleína (rojo de bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietilentriamina; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno- 2,2'-disulfónico; 5-[dimetilamino]naftaleno-1-cloruro de sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados como eosina e isotiocianato de eosina; eritrosina y derivados como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2ilo)aminofluoresceína (DTAF), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), y QFITC (XRITC); fluorescamina; IR144; IR1446; isotiocianato de malaquita verde; 4-metilumbelliferona; orto cresolfaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Rojo fenol; B-ficoeritrina; oftaldialdehído; pireno y derivados como pireno, butirato de pireno y succinimidilo 1-butilato de pireno; Rojo reactivo 4 (Rojo brillante 3B-A Cibacron™); rodamina y derivados como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-rodamina (R6G), cloruro de sulfonilo de lisamina rodamina B, rodamina (Rod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X; sulforodamina B, sulforodamina 101 y cloruro de sulfonilo derivado de sulforodamina 101 (Rojo Texas); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA); tetrametil rodamina; isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); riboflavina; ácido rosólico y derivados de quelato de terbio; Rojo de LightCycler 640; Cy5,5; y Cy56-carboxifluoresceína; 5-carboxifluoresceína (5-FAM); difluorido dipirrometeno de boro (BODIPY); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA); acridina, estilbeno, -6-carboxi-fluoresceína (HEX), TET (Tetrametil fluoresceína), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), Rojo Texas, 2',7'-dimetoxi-4',5'- dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), Cy3, Cy5, VIC® (Applied Biosystems), Rojo LC 640, Rojo LC 705, amarillo Yakima entre otros.

Otros fluoróforos adecuados incluyen aquellos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, los comercializados por Molecular Probes (Eugene, OR). En algunos ejemplos, la molécula fluorescente es carboxifluoresceína succinimidil éster u otro compuesto similar.

El método incluye determinar la relación de absorción del antígeno donante (o receptor) en la primera muestra para la captación del antígeno tercero en la segunda muestra midiendo la fluorescencia de las dos muestras.

En una realización, la captación se puede medir por clasificación de las células activadas fluorescentes (FACS). La FACS emplea una pluralidad de canales de color, detección de dispersión de la luz obtusa y de ángulo bajo y canales de impedancia, entre otros niveles de detección más sofisticados, para separar o clasificar las células. Se puede emplear cualquier técnica FACS siempre que no sea perjudicial para la viabilidad de las células deseadas (para los métodos ejemplares, ver la Patente USA N° 5.061.620).

Por ejemplo, la muestra que incluye las APCs se obtiene de sangre, bazo o médula ósea. En algunas realizaciones, la primera muestra y/o la segunda muestra que contienen las APCs son linfocitos de sangre periférica o leucocitos de sangre periférica.

El antígeno puede ser un antígeno purificado o aislado. Así, el antígeno se puede sintetizar o producir mediante técnicas de biología molecular. El antígeno donante puede ser cualquier antígeno de interés del donante. Se puede utilizar un antígeno aislado, o más de un antígeno aislado, por ejemplo, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10 o más antígenos aislados.

En algunos ejemplos, el antígeno está incluido en una muestra biológica compleja, como un lisado celular o fracción. En algunos ejemplos, el antígeno es un lisado celular de linfocitos y/o leucocitos. En algunas realizaciones, el antígeno donante o el antígeno tercero incluye células del donante, un péptido antigénico, un péptido antigénico etiquetado con un fluorocromo o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, para evaluar el rechazo del trasplante, se utiliza un antígeno en el loci de los HLA-A, HLA-B o HLA-DR del donante en el método. En algunas realizaciones, se utiliza más de un antígeno en el loci de los HLA-A, HLA-B o HLA-DR del donante en el método. En realizaciones adicionales, se utiliza una combinación de antígenos del loci de los HLA-A, HLA-B y HLA-DR en los métodos. En un ejemplo, el antígeno donante incluye antígenos de linfocitos, leucocitos como leucocitos de sangre periférica o una combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el antígeno donante incluye membranas celulares lisadas de los leucocitos de sangre periférica, células del bazo, o células de la médula ósea del donante. En un ejemplo, el antígeno donante procede de un sujeto que tiene el mismo perfil de loci de HLA-A, HLA-B, o HLA-DR o uno muy similar que el donante, pero no es el donante.

En otras realizaciones, para evaluar la GVHD se utiliza en el método un antígeno en el loci de HLA-A, HLA-B o HLA-DR y otro HLA del receptor.

En otras realizaciones, se utiliza en el método más de un antígeno en el loci de HLA-A, HLA-B o HLA-DR del receptor para detectar GVHD. En otras realizaciones, se utiliza una combinación de antígenos del loci de HLA-A, HLA-B y HLA-DR y otro HLA en este método. En un ejemplo, el antígeno receptor incluye antígenos de linfocitos, leucocitos, por ejemplo, leucocitos de sangre periférica o una combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el antígeno receptor incluye membranas celulares lisadas de los leucocitos de sangre periférica, células del bazo, o células de la médula ósea del receptor. En un ejemplo, el antígeno receptor procede de un sujeto que tenía el mismo perfil de loci o muy similar de HLA-A, HLA-B, o HLA-DR y otro HLA que el receptor, pero no es el receptor. En un ejemplo, se utilizan antígenos de los HLA menores que no sean HLA-A, -B y -DR, o además de estos.

El antígeno tercero puede ser de cualquier sujeto que sea alogénico tanto para el donante como para el receptor. Se puede utilizar un antígeno o más de un antígeno. En algunas realizaciones, se utiliza en el método un antígeno en el loci de los HLA-A, HLA-B o HLA-DR y otro HLA de un tercero. En otras realizaciones, se utiliza en el método más de un antígeno en el loci de los HLA-A, HLA-B o HLA-DR y otro HLA tercero. En otras realizaciones, se utiliza una combinación de antígenos del loci de los HLA-A, HLA-B y HLA-DR y otro HLA de terceros en los métodos. Entre los ejemplos de muestras de antígenos terceros también se incluyen linfocitos, leucocitos, por ejemplo, leucocitos de sangre periférica o una combinación de los mismos. Por ejemplo, las muestras de antígenos terceros incluyen membranas de células lisadas de leucocitos de sangre periférica, células del bazo o células de la médula ósea terceras.

En algunas realizaciones, el método se utiliza para valorar la dosis de un agente inmunosupresor que se proporciona al sujeto o evidenciar la eficacia de un régimen inmunosupresor para el tratamiento del rechazo del trasplante. Por ejemplo, a un sujeto se le administra un primer tratamiento con un régimen inmunosupresor. Se obtiene una primera muestra, que incluye las APCs, por ejemplo, linfocitos B de un sujeto que ha recibido un trasplante de órganos de un donante y se pone en contacto con un antígeno donante del donante, en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno donante. Se obtiene una segunda muestra, que incluye las APCs, como linfocitos B, del sujeto y se pone en contacto con un antígeno tercero, en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno tercero. A continuación, se determina la relación de captación del antígeno donante en la primera muestra a captar del antígeno tercero en la segunda muestra. Una proporción mayor de uno indica el rechazo de órganos en el sujeto e indica que debería aumentarse la inmunosupresión o que se debería utilizar un régimen inmunosupresor diferente. Una relación inferior a uno indica la ausencia de rechazo de órganos en el sujeto e indica que se puede mantener o disminuir la inmunosupresión, o indica que el régimen inmunosupresor es apropiado para el sujeto. Los métodos se pueden repetir de modo que el sujeto esté controlado con regularidad. Por ejemplo, el método se puede repetir diariamente, cada dos semanas, semanalmente, cada dos meses o mensualmente. El agente

inmunosupresor puede incluir, a título meramente enunciativo, un esteroide, ciclosporina A, anti-CD3 y anti-CD25 (como dadizumbab), citoquinas, rapamicina, o cualquier otro agente inmunosupresor de interés incluyendo, entre otros, tacrolimus,

bortezimib, alemtuzumab, globulina anti-timocítica humana, globulina anti-linfocitos, micofenolato mofetilo, etc.

- 5 En algunas realizaciones, el método se utiliza para evaluar el grado de rechazo del órgano. Por ejemplo, un API más alto está asociado con un rechazo más grave que con un rechazo leve. Para describirlo con más detalle, un API más alto está asociado con un rechazo resistente a los esteroides en lugar de con un rechazo sensible a los esteroides.

En algunas realizaciones, el método se utiliza para valorar la dosis de un agente inmunosupresor que se administra al sujeto o evidenciar la eficacia de un régimen inmunosupresor para el tratamiento de la GVHD. Por ejemplo, se administra a un sujeto un primer tratamiento con un régimen inmunosupresor. Se obtiene una primera muestra que contiene las APCs, por ejemplo, linfocitos B de un sujeto que ha recibido un trasplante de órganos de un donante y se pone en contacto con un antígeno receptor del receptor, en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno receptor. Se obtiene una segunda muestra que contiene las APCs, por ejemplo, linfocitos B, del sujeto y se pone en contacto con un antígeno tercero, en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno tercero, Se determina la relación de la captación del antígeno receptor en la primera muestra con respecto a la captación del antígeno tercero en la segunda muestra. Una relación mayor de uno indica GVHD en el sujeto e indica que se debe aumentar la inmunosupresión, o que se debe utilizar otro régimen inmunosupresor. Una relación inferior a uno indica la ausencia de GVHD en el sujeto e indica que se puede mantener o disminuir la inmunosupresión, o indica que el régimen inmunosupresor es apropiado para el sujeto. Las cifras del API <0,9, o <0,1 indican una disminución del riesgo, mientras que un API >1,2 o >2 o >3 indicaría un aumento del riesgo de GVHD. Los métodos se pueden repetir de modo que el sujeto esté controlado con regularidad. Por ejemplo, el método se puede repetir diariamente, cada dos semanas, semanalmente, cada dos meses o mensualmente. El agente inmunosupresor puede incluir, aunque sin limitación, esteroides, ciclosporina A, anti-CD4 y anti-CD25 (como daclizumbab), citoquinas, rapamicina, o cualquier otro agente inmunosupresor de interés incluyendo, entre otros, tacrolimus bortezimib, alemtuzumab, globulina anti-timocítica humana, globulina anti-linfocitos, micofenolato mofetilo, etc.

En algunas realizaciones del método para detectar el rechazo del trasplante, la determinación de la relación de captación del antígeno donante en la primera muestra en comparación con la captación del antígeno tercero en la segunda muestra incluye la detección de una pluralidad de biomarcadores después del tratamiento con el antígeno donante con la primera muestra compuesta por las células presentadoras de antígeno y el antígeno tercero con la segunda muestra compuesta por las células presentadoras de antígeno, y comparar la expresión de la pluralidad de biomarcadores tras el tratamiento con el antígeno donante en la expresión de los biomarcadores tras el tratamiento con el antígeno tercero para determinar el API. Por ejemplo, los marcadores clasifican un linfocito B como memoria o naïve o como precursores de células plasmáticas, basado en si expresan CD27, IgA, IgM, IgG, IgD, CD25, CD5,

CD 10, CD154, CD138, CD19, CD38, CD24, CTLA4, etc. En otras realizaciones, para detectar la GVHD, la determinación de la relación de captación del antígeno receptor en la primera muestra con la captación del antígeno tercero en la segunda muestra incluye la detección de una pluralidad de biomarcadores en las células presentadoras de antígeno después del tratamiento con el antígeno receptor con la primera muestra compuesta por las células presentadoras de antígeno y el antígeno tercero con la segunda muestra compuesta por las células presentadoras de antígeno, y comparar la expresión de la pluralidad de biomarcadores tras el tratamiento con el antígeno receptor en la expresión de los biomarcadores tras el tratamiento con el antígeno tercero para determinar el índice presentador de antígenos.

En algunos ejemplos, la pluralidad de biomarcadores incluye al menos uno de CD27, IgM, IgA, IgD, CD5, CD10, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o los seis marcadores. En otros ejemplos, biomarcadores adicionales como marcadores de células de memoria, marcadores de células plasmáticas, marcadores de activación de linfocitos B, marcadores de leucocitos/linfocitos, marcadores de viabilidad celular y otros marcadores conocidos por el experto en la técnica por ser útiles para controlar el rechazo del órgano trasplantado. En algunos ejemplos, marcadores adicionales incluyendo IgG (marcador de células de memoria), CD19, CD38 (marcador de células plasmáticas), CD138 (marcadores de activación de células plasmáticas), CD 154 (marcador de activación de linfocitos B), CTLA4 (marcador co-estimulador de linfocitos B negativos), CD45 (marcador de linfocitos/pan-leucocitos) o cualquier combinación de los mismos. Por lo tanto, el método también puede incluir la medición de linfocitos B y T, como linfocitos T de memoria que expresan linfocitos B CTLA4 o CD154 y/o CD154+CD19+.

En una realización, el método incluye la evaluación del API y el número de linfocitos B inflamatorios específicos del donante que expresan CD 154. En otro ejemplo, el método incluye la evaluación del API y el número de linfocitos T de memoria citotóxicos CTLA4+T.

55 En otro ejemplo, el método incluye la medición del API y el número de linfocitos B CD154+CD19+. Por ejemplo, el API se correlaciona positivamente con linfocitos B inflamatorios específicos del donante, que expresan CD154 y CD19. De este modo, un API superior a uno indica un aumento de linfocitos CD 154+ y CD 19 en la muestra receptora. En otro ejemplo, el API está correlacionado negativamente con linfocitos de memoria citotóxicos T específicos del donante antiinflamatorios que expresan CTLA4. En este ejemplo, un API superior a uno indica menos linfocitos CTLA4 T en la muestra donante.

En otro ejemplo, el API se correlaciona negativamente con linfocitos B inflamatorios específicos del donante que expresan el marcador CTLA4 en el que un índice API superior a uno indica menos linfocitos B CTLA4 en la muestra donante. El método puede incluir la medición de uno o más de estos tipos de células.

En algunos ejemplos, la pluralidad de biomarcadores incluye al menos CD27, IgM, IgA, IgD, IgG, CD5 y CD 10. Se contempla la posibilidad de que también se puedan detectar biomarcadores adicionales, como primeros marcadores de linaje de linfocitos B, CD24 y CD 179b, marcadores de células de memoria adicionales (*por ejemplo*, IgG), CD19, CD38 (marcador de células plasmáticas) y CD 138 (marcadores de activación de células plasmáticas), CD 154 (marcador de activación de linfocitos B), CTLA4 (marcador co-estimulador de linfocitos B negativos), CD45 (marcador de linfocitos/pan-leucocitos), CD25, CD3, 7-AAD, CD69, CD71, CD86 IFN- gamma, IL-2, TNF alfa, CD45RA, CCR7 y CD54. Por tanto, en algunas realizaciones, el método incluye la medición del número de linfocitos B que expresan uno o más de CD27, IgM, IgA, IgG, IgD, CD5 y CD 10. En otras realizaciones, el método incluye la medición del número de linfocitos B de memoria, células plasmáticas, o linfocitos B activados. En algunos ejemplos, los linfocitos IgD+B se consideran linfocitos B naive. En otros ejemplos, un linfocito CD27+ o IgG+ B se considera que es un linfocito B de memoria. En algunos ejemplos, los biomarcadores adicionales incluyen uno o más marcadores de linfocitos B que se describen en Linas *et al.* (*Immunology Letters* 134: 113- 121.2011).

En algunas realizaciones, los niveles de expresión de una pluralidad de biomarcadores se miden utilizando FACS. Se puede utilizar cualquier técnica FACS (incluyendo las variantes basadas en principios de citometría de flujo, por ejemplo, la visualización de espectrometría de masas de marcadores celulares con ligandos metálicos) o cualquier otra captación de imágenes celulares siempre que no sea perjudicial para la viabilidad de las células deseadas (para ejemplos de métodos de FACS ver Patente USA No 5. 061.620).

Sin embargo, se pueden emplear otras técnicas de distinta eficacia para aislar y enumerar las poblaciones de células deseadas. Las técnicas de separación empleadas deben maximizar la retención de la viabilidad de la fracción de las células que se van a recoger. La técnica empleada dependerá, por supuesto, de la eficiencia de la separación, la citotoxicidad del método, la facilidad y velocidad de separación, y el tipo de equipo y/o habilidad técnica requeridos. Los procedimientos de separación pueden incluir la separación magnética, utilizando perlas paramagnéticas recubiertas de anticuerpos, cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos, o bien unidos a un anticuerpo monoclonal o utilizados conjuntamente con complemento y 'panning', que utiliza un anticuerpo monoclonal que se adhiere a una matriz sólida u otra técnica apropiada. Los anticuerpos adheridos a perlas paramagnéticas y otras matrices sólidas, como perlas de agarosa, perlas de poliestireno, membranas de fibra hueca y placas Petri de plástico, permiten la separación directa. Las células que están unidas por el anticuerpo se pueden retirar de la suspensión celular simplemente separando físicamente el soporte sólido de la suspensión celular. Las condiciones exactas y la duración de la incubación de las células con los anticuerpos vinculados de la fase sólida dependerán de varios factores específicos del sistema empleado. Sin embargo, la selección de las condiciones apropiadas, entra dentro de los conocimientos generales del experto en la técnica.

A continuación, las células independientes se pueden eluir o lavar con un tampón fisiológico después de que se haya dejado pasar el tiempo suficiente para que las células expresen un marcador de interés (como un antígeno que una a uno o más de los anticuerpos monoclonales que se aquí) para unirse a los anticuerpos vinculados a la fase sólida. A continuación, las células unidas se separan de la fase sólida con cualquier método apropiado, dependiendo principalmente de la naturaleza de la fase sólida y el anticuerpo empleado.

Por ejemplo, la presencia y cantidad de los diferentes marcadores biológicos se mide con el etiquetado de las células con colorantes específicos del marcador que pueden ser detectados y diferenciados por citometría de flujo. Se pueden utilizar colorantes conocidos por el experto en la técnica, como diacetato de carboxilofluoresceína éster succinidil (DCFES, Molecular Probes, Eugen, Oregón), EMA (colorante de viabilidad celular, 7-AAD (colorante de viabilidad celular) y puntos cuánticos que tengan, por ejemplo, espectros de emisión entre 545 nm y 800 nm (Quantum Dot Corp. Hayward, California), para detectar los marcadores deseados.

Aunque se puede utilizar cualquier equipo y metodología adecuado para medir los múltiples parámetros, en un ejemplo se utiliza un citómetro de flujo. Se utilizan citómetros de flujo que pueden detectar y diferenciar al menos 4 (y más preferiblemente al menos 7) marcadores de diferentes colores. En algunos ejemplos, se utiliza un citómetro de flujo que puede detectar y diferenciar al menos 10, por ejemplo, al menos 15, al menos 20 o, al menos 30 marcadores de diferentes colores. En algunos ejemplos, se utiliza un citómetro de flujo que puede medir y comparar al menos 25 parámetros múltiples o más, por ejemplo más de 50 parámetros múltiples o incluso más de 100 parámetros múltiples. Estas funciones de citometría de flujo existen en las plataformas de espectrometría de masas nuevas que detectan las etiquetas con colorante metálicas. Los métodos de uso de una máquina de citometría de flujo son conocidos por el experto en la técnica.

3. Métodos adicionales

Los métodos descritos también se pueden utilizar para determinar la respuesta del linfocito B a otros antígenos, incluyendo antígenos de alérgenos, patógenos infecciosos, tumores o asociados con trastornos y enfermedades autoinmunes. Los patógenos infecciosos incluyen bacterias, hongos, protistas, priones y/o virus. Estos usos adicionales pueden realizarse aisladamente o además de diagnosticar o predecir el rechazo del órgano trasplantado.

En algunas realizaciones, el método se utiliza para detectar la reactividad a un antígeno de un patógeno. Por

ejemplo, el método incluye la determinación de un API comparando la captación de un antígeno de un primer patógeno con la captación de un antígeno de un segundo patógeno (de referencia) por las APCs de un sujeto de interés. Un API > 1 indica una mayor probabilidad de infección con el primer patógeno y una disminución de la probabilidad de infección con el segundo patógeno. Por ejemplo, un API superior a 1,2, superior a 1,5, superior a 1,75, superior a 2, superior a 3, superior a 4, superior a 5, superior a 6, superior a 7, superior a 8, superior a 9 o superior a 10 puede indicar una mayor probabilidad de infección con el primer patógeno. Un API < 1, por ejemplo, entre 0,1 a 0,95 o 0,3 a 0,85, indica una disminución de la probabilidad de infección con el primer patógeno, y una mayor probabilidad de infección con el segundo patógeno. Por ejemplo, un API inferior a 0,9, inferior a 0,75, inferior a 0,5, inferior a 0,1 o inferior a 0,1 puede indicar un aumento de la probabilidad de infección por el segundo patógeno, y una disminución de la probabilidad de infección por el segundo patógeno.

En algunas realizaciones del método, determinar el índice presentador de antígenos comprende poner en contacto una primera parte de la muestra biológica que contiene las APCs obtenidas de un sujeto en riesgo de contraer o que se conoce que padece una enfermedad o estado específico, por ejemplo, una infección viral, micótica o bacteriana, con un primer antígeno de un primer patógeno viral, micótico o bacteriano, en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno; poner en contacto una segunda porción de la muestra biológica que contiene las APCs obtenidas del sujeto en riesgo de contraer o que se conoce que padece una enfermedad o estado específico, con una segunda referencia o un antígeno no patógeno de un patógeno diferente, en condiciones suficientes para inducir la captación del segundo antígeno; y determinar la relación de captación del primer antígeno en la primera porción de la muestra biológica con la captación del segundo antígeno en la segunda porción de la muestra biológica. Un aumento en la captación del primer antígeno en comparación con la captación del segundo antígeno (de referencia) indica que el sujeto tiene una infección con el primer patógeno. Un aumento en la captación del segundo antígeno en comparación con la captación del primer antígeno indica que el sujeto tiene una infección con el segundo patógeno. Otra forma en que la captación de un antígeno patógeno puede indicar la gravedad de la enfermedad es si supera un umbral establecido en pacientes con diversos niveles de gravedad de la enfermedad.

Un API superior a uno indica la presencia de un estado determinado, por ejemplo, una infección con el primer patógeno, con una sensibilidad de al menos el 90% e indica la presencia de infección con una especificidad de al menos el 90% para riesgo de infección o de contraer la enfermedad o la presencia de una infección o enfermedad. En algunos ejemplos, los métodos que se describen en el presente documento tienen una sensibilidad de al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. En algunos ejemplos, los métodos que se describen en el presente documento tienen una especificidad de al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%.

De forma similar, un API superior a uno indica la presencia de una condición determinada, por ejemplo, una infección con el primer patógeno, con una sensibilidad de al menos un 90% indica la presencia de infección con una especificidad de al menos el 90% para el riesgo de infección o de contraer la enfermedad o la presencia de una infección o enfermedad. En algunos ejemplos, los métodos que se describen en el presente documento tienen una sensibilidad de al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. En algunos ejemplos, los métodos que se describen en el presente documento tienen una especificidad de al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%.

El primer y segundo patógeno de interés puede ser cualquier alérgeno, bacteria, hongos o virus incluyendo los aquí descritos.

i. Patógenos virales

Ejemplos concretos de patógenos virales incluyen, sin limitación, cualquiera (o cualquier combinación) de uno o más Arenavirus (como virus Guanarito, virus Lassa, virus Junin, virus Machupo y Sabia), Arterivirus, Ronivirus, Astrovirus, Bunyavirus (como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo y Hantavirus), Bamavirus, Bimavirus Bornavirus (como el virus de la enfermedad de Borna), Bromovirus, Calicivirus, Crisovirus, Coronavirus (como coronavirus y SARS), Cistovirus, Closterovirus, Comovirus, Dicistovirus, Flavivirus (como el virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo Occidental, virus de la hepatitis C y virus de la fiebre del dengue), Filovirus (como el virus Ebola y virus de Marburgo), Flexivirus, Hepevirus (como el virus de la hepatitis E), adenovirus humano (como adenovirus humano A-F), astrovirus humanos, poliomavirus BK humano, bocavirus humano, coronavirus humano (como un coronavirus humano HKU1, NL63 y OC43), enterovirus humanos (como enterovirus humanos A-D), eritrovirus humano V9, espumavirus humanos, herpesvirus humanos (como herpesvirus humanos 1 (virus del herpes simple tipo 1), herpesvirus humanos 2 (virus del herpes simple tipo 2), herpesvirus humanos 3 (virus varicela zoster), herpesvirus humanos 4 tipo 1 (virus de Epstein-Barr tipo 1), herpesvirus humano 4 tipo 2 (virus de Epstein-Barr tipo 2), herpesvirus humano 5 cepa AD 169, herpesvirus humano 5 cepa Merlin, herpesvirus humano 6A, herpesvirus humano 6B, herpesvirus humano 7, herpesvirus humano 8 tipo M, herpesvirus humano 8 tipo P y Citomegalovirus humano), virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (como VIH 1 y VIH 2), metapneumovirus humanos, papilomavirus humanos, virus de la parainfluenza humanos (como los virus de la parainfluenza humanos 1 a 3), parechovirus humanos, parvovirus humanos (como parvovirus humano 4 y parvovirus humano B19), virus sincitiales

respiratorios humanos, rinovirus humanos (como rinovirus humano A y rinovirus humano B), espumaretrovirus humanos, virus linfotróficos T humanos (como virus linfotrófico T humano y virus linfotrófico T humano 2), virus del poliooma humanos, Hipovirus, Levivirus, Luteovirus, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM), Mamavirus, Namavirus, Nidovirales, Nodavirus, Ortomixovirus (como virus de la gripe), Partitivirus, Paramixovirus (como virus del sarampión y virus de las paperas), Picornavirus (como poliovirus, virus del resfriado común, y virus de la hepatitis A), Potivirus, Poxvirus (como viruela), Sequivirus, Reovirus (como Rotavirus), Rhabdovirus (como virus de la rabia), Rhabdovirus (como virus de la estomatitis vesicular, Tetravirus, Togavirus (como virus de la Rubéola y virus del río Ross), Tombusvirus, Totivirus, Timovirus y Norovirus, entre otros.

Los antígenos virales pueden proceder del virus de la hepatitis C (VHC). Los antígenos de la VHC se pueden seleccionar de una o más poliproteínas E1, E2, E1/E2, NS345, poliproteínas NS 345-core, core y/o péptidos de las regiones no estructurales (Houghton *et al.* (1991) *Hepatology* 14:381-388).

Los antígenos virales pueden derivarse de un virus herpes humano, como virus herpes simple (VHS), virus de la varicela zóster (VZV), virus de Epstein-Barr (VEB) o citomegalovirus (CMV). Los antígenos del virus herpes humano se pueden seleccionar de proteínas tempranas inmediatas, proteínas tempranas y proteínas tardías. Los antígenos del VHS pueden derivarse de cepas VHS-1 o VHS-2. Los antígenos del VHS se pueden seleccionar de glicoproteínas gB, gC, gD y gH, o proteínas de escape del sistema inmune (gC, gE, o g1). Los antígenos VZV se pueden seleccionar de proteínas del núcleo, de la nucleocápsida, del tegumento o de la envoltura.

Está disponible comercialmente una vacuna VZV viva atenuada. Los antígenos del VEB se pueden seleccionar de proteínas de antígeno tempranas (EA), antígeno de la cápside viral (VCA) y glicoproteínas del antígeno de la membrana (MA). Los antígenos de CMV se pueden seleccionar de proteínas de la cápside, glicoproteínas de la envoltura (como gB y gH), y proteínas del tegumento. Entre los ejemplos de antígenos del herpes se incluyen (Nº acceso GENBANK™ en paréntesis) los derivados del herpesvirus humano 1 (virus Herpes simplex tipo 1) (NC_001806), herpesvirus humano tipo 2 (virus Herpes simplex tipo 2) (NC_001798), herpesvirus humano tipo 3 (virus varicela zoster) (NC_001348), herpesvirus humano 4 tipo 1 (virus de Epstein-Barr tipo 1) (NC_007605), herpesvirus humano 4 tipo 2 (virus de Epstein-Barr tipo 2) (NC_009334), herpesvirus humano 5 cepa AD 169 (NC_001347), herpesvirus humano 5 cepa Merlin (NC_006273), herpes virus humano tipo 6A (NC_001664), herpes virus humano tipo 6B (NC_000898), herpesvirus humano 7 (NC_001716), herpesvirus humano 8 tipo M (NC_003409) y herpesvirus humano 8 tipo P (NC_009333).

Los antígenos del virus del papiloma humano (VPH) son conocidos en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en la publicación internacional de la Patente Nº W096/19496, que describe las variantes de proteínas de VPH E6 y E7, especialmente las proteínas de fusión de E6/E7 con supresión de ambas proteínas de E6 y E7. Los antígenos con base de VPH L1 se describen en la publicación internacional de la Patente Nº W094/00152, W094/20137, W093/02184 y W094/05792. Dicho antígeno puede incluir el antígeno L1 como un monómero, un capsómero o una partícula similar a un virus. Dichas partículas además pueden contener proteínas L2. Otros antígenos de VPH son proteínas tempranas, como E7 o proteínas de fusión como L2-E7. Entre los ejemplos de antígenos VPH se incluyen (Nº acceso GENBANK™ en paréntesis) los derivados del papilomavirus humano 1 (NC_001356), papilomavirus humano 18 (NC_001357), papilomavirus humano 2 (NC_001352), papilomavirus humano 54 (NC_001676), papilomavirus humano 61 (NC_001694), papilomavirus humano cand90 (NC_004104), papilomavirus humano RTRX7 (NC_004761), papilomavirus humano tipo 10 (NC_001576), papilomavirus humano tipo 101 (NC_008189), papilomavirus humano tipo 103 (NC_008188), papilomavirus humano tipo 107 (NC_009239), papilomavirus humano tipo 16 (NC_001526), papilomavirus humano tipo 24 (NC_001683), papilomavirus humano tipo 26 (NC_001583), papilomavirus humano tipo 32 (NC_001586), papilomavirus humano tipo 34 (NC_001587), papilomavirus humano tipo 4 (NC_001457), papilomavirus humano tipo 41 (NC_001354), papilomavirus humano tipo 48 (NC_001690), papilomavirus humano tipo 49 (NC_001591), papilomavirus humano tipo 5 (NC_001531), papilomavirus humano tipo 50 (NC_001691), papilomavirus humano tipo 53 (NC_001593), papilomavirus humano tipo 60 (NC_001693), papilomavirus humano tipo 63 (NC_001458), papilomavirus humano tipo 6b (NC_001355), papilomavirus humano tipo 7 (NC_001595), papilomavirus humano tipo 71 (NC_002644), papilomavirus humano tipo 9 (NC_001596), papilomavirus humano tipo 92 (NC_004500), y papilomavirus humano tipo 96 (NC_005134).

Los antígenos virales pueden derivarse de un retrovirus, por ejemplo, un oncovirus, ulentivirus o espumavirus. Los antígenos de oncovirus pueden derivarse de HTLV-1, HTLV-2 o HTLV-5. Los antígenos de entivirus pueden derivarse del VIH-1 o el VIH-2.

Los antígenos de retrovirus pueden seleccionarse de gag, pol, env, tax, tat, rex, rev, nef, vif, vpr y vpu. Los antígenos para el VIH son conocidos en la técnica, por ejemplo, los antígenos del VIH pueden seleccionarse de gag (p24gag y p55gag), env (gp160 y gp41), pol, tat, nef, rev vpr, miniproteínas, (p55 gag y gp140v). Los antígenos del VIH pueden derivarse de una o más de las siguientes cepas: HIVmb, HIV; HIVLAV, HIVLAI, HIVM N, HIV-1 CM235, HIV-1 US4. Se pueden encontrar ejemplos de antígenos del VIH en la publicación internacional de la Patente Nº W009/089568, W009/080719, W008/099284 y W000/15255, y USA Nº 7.531,181 y 6.225,443. Entre los ejemplos de antígenos de VIH se incluyen aquellos que se derivan del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (NC_001802), virus de la inmunodeficiencia humana 2 (NC_001722).

ii. Alérgenos

Entre los ejemplos de alérgenos (que son antígenos no parásitos capaces de estimular una reacción de

hipersensibilidad de tipo 1) se incluyen aquellos que provienen de plantas, como árboles, por ejemplo, alérgenos de *Betula verrucosa* Bet v 1, Bet v 2, y Bet v 4; *Juniperus oxycedrus* Jun o 2; *Castanea sativa* Cas s 2; y alérgenos de *Hevea brasiliensis* Hev b 1, Hev b 3, Hev b 8, Hev b 9, Hev b 10 y Hev b 11; hierbas, como alérgenos de *Phleum pratense* Ph1 p 1, Ph1 p 2, Ph1 p 4, Ph1 p 5 a, Ph1 p 5, Ph1 p 6, Ph1 p 7, Ph1 p 11 y Ph1 p 12; malas hierbas, como el alérgeno de *Parietaria judaica* Par j 2,01011; y alérgenos de *Artemisia vulgaris* Art v 1 y Art v 3; ácaros, como alérgenos de *Dematophagoides pteronyssinus* Der p 1, Der p 2, Der p 5, Der p 7, Der p 8 y Der p 10; *Tyrophagus putrescentiae* Tyr p 2; *Lepidoglyphus destructor* Lep d 2,01 y Lep d 13; y alérgeno de *Euroglyphus maynei* Eur m 2,0101; animales, como gatos, por ejemplo, el alérgeno de *Felis domesticus* Fel d 1; *Penaeus aztecus* Pen a 1; *Cyprinus carpio* Cyp c 1; y albúmina de un gato, perro, ganado, ratón, rata, cerdo, oveja, pollo, conejo, hámster, caballo, paloma y conejillo de Indias; hongos, como los alérgenos de *Penicillium citrinum* Pen c 3 y Pen c 19; *Penicillium notatum* Pen n 13; *Aspergillus fumigatus* Asp f 1, Asp f 3, Asp f 4, Asp f 6, Asp f 7 y Asp f 8; *Alternaria alternata* Alt a 1 y Alt a 5; *Malassezia furfur* Mai f 1, Mai f 5, Mai f 6, Mai f 7, Mai f 8 y Mai f 9; insectos, como alérgenos de *Glatella germanica* Bla g 2, Bla g 4 y Bla g 5; *Apis mellifera* Api m 2 y Api m 1; *Vespula vulgaris* Ves v 5; *Vespula germanica* Ves g 5; y alérgeno de *Polistes annularis* Pol a 5; alimentos, como alérgenos de *Malus domestica* Mai d 1 y Mai d 2; *Apium graveolens* Api g 1 y Api g 1.0201; *Daucus carota* Dau c 1; y alérgenos de *Arachis hypogaea* Ara h 2 y Ara h 5 y similares.

iii. Patógeno bacteriano

Ejemplos específicos de patógenos bacterianos incluyen, sin limitación, uno cualquiera o más (o cualquier combinación) de *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus*, sp. *Actinomycetes*, *Actinomyces* sp. (como *Actinomyces israelii* y *Actinomyces naeslundii*), *Aeromonas* sp. (como *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii biovar sobria* (*Aeromonas sobria*), y *Aeromonas caviae*), *Anaplasma phagocytophilum*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacillus* sp. (como *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, y *Bacillus stearothermophilus*), *Bacteroides* sp. (como *Bacteroides fragilis*), *Bartonella* sp. (como *Bartonella bacilliformis* y *Bartonella henselae*, *Bifidobacterium* sp., *Bordetella* sp. (como *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, y *Bordetella bronchiseptica*), *Borrelia* sp. (como *Borrelia recurrentis*, y *Borrelia burgdorferi*), *Brucella* sp. (como *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis*), *Burkholderia* sp. (como *Burkholderia pseudomallei* y *Burkholderia cepacia*), *Campylobacter* sp. (como *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* y *Campylobacter fetus*), *Capnocytophaga* sp., *Cardiobacterium hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Citrobacter* sp. *Coxiella burnetii*, *Corynebacterium* sp. (como, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium jeikeum* y *Corynebacterium*), *Clostridium* sp. (como *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani*), *Eikenella corrodens*, *Enterobacter* sp. (como *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*, incluidos *Escherichia coli* oportunistas, como *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroagregativa y *E. coli* uropatógena) *Enterococcus* sp. (como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*) *Ehrlichia* sp. (como *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis*), *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Eubacterium* sp., *Francisella tularensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Gemella morbillorum*, *Haemophilus* sp. (como *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus haemolyticus* y *Haemophilus paraahaemolyticus*, *Helicobacter* sp. (como *Helicobacter pylori*, *Helicobacter cinaedi* y *Helicobacter fennelliae*), *Kingella kingii*, *Klebsiella* sp. (como *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella granulomatis* y *Klebsiella oxytoca*), *Lactobacillus* sp., *Listeria monocytogenes*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Peptostreptococcus* sp., *Moraxella catarrhalis*, *Morganella* sp., *Mobiluncus* sp., *Micrococcus* sp., *Mycobacterium* sp. (como *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, y *Mycobacterium marinum*), *Mycoplasma* sp. (como *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, y *Mycoplasma genitalium*), *Nocardia* sp. (como *Nocardia asteroides*, *Nocardia*

cyriaci-georgica y *Nocardia brasiliensis*), *Neisseria* sp. (como *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*), *Pasteurella multocida*, *Plesiomonas shigelloides*, *Prevotella* sp., *Porphyromonas* sp., *Prevotella melaninogenica*,

Proteus sp. (como *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis*), *Providencia* sp. (como *Providencia alcalifaciens*, *Providencia rettgeri* y *Providencia stuartii*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes*, *Rhodococcus equi*, *Rickettsia* sp. (como *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia akari* y *Rickettsia prowazekii*, *Orientia tsutsugamushi* (anteriormente: *Rickettsia tsutsugamushi*) y *Rickettsia typhi*), *Rhodococcus* sp., *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Salmonella* sp. (como *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhimurium*), *Serratia* sp. (como *Serratia marcescens* y *Serratia liquifaciens*), *Shigella* sp. (como *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*), *Staphylococcus* sp. (como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*), *Streptococcus* sp. (como *Streptococcus pneumoniae* (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae* resistente al cloranfenicol

del serotipo 4, *Streptococcus pneumoniae* resistente a la espectinomicina del serotipo 6B, *Streptococcus pneumoniae* resistente a la estreptomina del serotipo 9V, *Streptococcus pneumoniae* resistente a la eritromicina del serotipo 14, *Streptococcus pneumoniae* resistente a la optocina serotipo 14, *Streptococcus pneumoniae* resistentes

a la rifampicina serotipo 18C, *Streptococcus pneumoniae* resistentes a tetraciclina serotipo 19F, *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina serotipo 19F y *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la trimetoprima serotipo 23F, *Streptococcus pneumoniae* resistentes al cloranfenicol serotipo 4, *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la espectinomicina serotipo 6B, *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la estreptomidina serotipo 9V, *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la optoquina serotipo 14, *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la rifampicina serotipo 18C, *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la penicilina serotipo 19F o *Streptococcus pneumoniae* resistentes a la trimetoprima serotipo 23F), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, estreptococos del grupo A, *Streptococcus pyogenes*, estreptococos del grupo B, *Streptococcus agalactiae*, estreptococos del grupo C, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus equismilis*, estreptococos del grupo D, *Streptococcus bovis*, estreptococos del grupo F, y *Streptococcus anginosus*, estreptococos del grupo G), *Spirillum minus*, *Streptobacillus moniliformi*, *Treponema sp.* (como *Treponema carateum*, *Treponema petenue*, *Treponema pallidum* y *Treponema endemicum*, *Tropheryma whippellii*, *Ureaplasma urealyticum*, *Veillonella sp.*, *Vibrio sp.* (como *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio metchnikovii*, *Vibrio damsela* y *Vibrio fumisii*), *Yersinia sp.* (como *sYersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, y *Yersinia pseudotuberculosis*) y *Xanthomonas maltophilia* entre otros.

Los antígenos bacterianos adecuados para el uso en los métodos descritos incluyen proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos y vesículas de membrana externa que se pueden aislar, purificar o derivar de una bacteria. Además, los antígenos bacterianos incluyen lisados bacterianos y formulaciones de bacterias inactivadas. Los antígenos bacterianos se pueden producir por expresión recombinante. Los antígenos bacterianos incluyen preferiblemente epitopos que se exponen en la superficie de las bacterias durante al menos una fase de su ciclo de vida. Los antígenos bacterianos incluyen, entre otros, antígenos derivados de una o más de las bacterias indicadas anteriormente además de los ejemplos de antígenos específicos que se indican a continuación.

Los antígenos de la gonorrea por *Neisseria* incluyen proteína Por (o porina), como PorB (ver *por ejemplo*, Zhu *et al.* (2004) *Vaccine* 22:660-669), una transferencia de proteínas vinculantes, como TbpA y TbpB (ver *por ejemplo* Price *et al.* (2004) *Infect. Immun.* 71(1):277-283), una proteína de opacidad (como Opa), una proteína de reducción modificable (Rpm) y preparados de vesículas de membrana externa (OMV) (ver, *por ejemplo*, Plante *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.* 182:848-855); WO/99/24578; WO/99/36544; WO/99/57280; y WO 02/079243).

Los antígenos de *Chlamydia trachomatis* inducen antígenos derivados de los serotipos A, B, Ba y C (agentes de tracoma, una causa de ceguera), serotipos Li, L3 (asociados con el linfogranuloma venéreo) y serotipos, D-K. Los antígenos de *Clamidia trachomas* también incluyen antígenos identificados en WO 00/37494; WO/03/049762; WO/03/068811; y WO 05/002619, que incluyen PepA (CT045), LcrE (CT089), Art (CT381), DnaK (CT396), CT398, OmpH-like (CT242), L7/L12 (CT316), OmcA (CT444), AtosS (CT467), CT547, Eno (CT587), HrtA (CT823), MurG (CT761), CT396 y CT761, y combinaciones específicas de estos antígenos.

Los antígenos de *Treponemapallidum* (sífilis) incluyen antígeno TmpA.

En algunas realizaciones, se puede utilizar un ensayo descrito para medir uno o más antígenos derivados de una enfermedad de transmisión sexual (ETS). Tales antígenos pueden proporcionar profilaxis o terapia de ETS como la clamidia, herpes genital, hepatitis (VHC), verrugas genitales, gonorrea, sífilis y/o chancro (ver WO 00/15255). Los antígenos pueden derivarse de una o más ETS bacterianas virales. Los antígenos de ETS virales que se pueden utilizar en la invención pueden derivarse, por ejemplo, del VHS, virus herpes simple (VHS-1 y VHS-2), papilomavirus humano (VPH), y hepatitis (VHC). Los antígenos de ETS bacterianas que se pueden utilizar en la invención pueden derivarse, por ejemplo, de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponemapallidum*, *Haemophilus ducreyi*, *E. coli*, y *Streptococcus agalactiae*.

iv. Hongos patógenos

Entre los ejemplos de hongos patógenos se incluyen uno o más de los siguientes: *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Epidemophyton floccosum*, *Microsporium canis*, *Pityrosporum orbiculare* (*Malassezia furfur*), *Candida sp.* (como *Candida albicans*), *Aspergillus sp.* (como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus clavatus*), *Cryptococcus sp.* (como *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus laurentii* y *Cryptococcus albidus*), *Histoplasma sp.* (como *Histoplasma capsulatum*), *Pneumocystis sp.* (como *Pneumocystis jirovecii*), y *Stachybotrys* (como *Stachybotrys chartarum*).

v. Parásitos

Entre los ejemplos de organismos parasitarios figuran la malaria (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*), esquistosomas, tripanosomas, Leishmania, Nematodos filarias, tricomoniasis, Sarcosporidiasis, Taenia (*T. saginata*, *T. solium*), Leishmania, Toxoplasma gondii, Trichinelosis (*Trichinella spiralis*) o Coccidiosis (especies de Eimeria).

vi. Antígenos tumorales

Entre los ejemplos de antígenos tumorales (antígenos producidos por células tumorales que pueden estimular respuestas inmunitarias de linfocitos T específicos del tumor) se incluyen uno o más de los siguientes: RAGE-1, tirosinasa, MAGE-1, MAGE-2, NY-ESO-1, Melan-A/MART-

1, glucoproteína (gp) 75, gp100, beta-catenina, antígeno expresado preferentemente de melanoma (PRAME), MUM-1, tumor de Wilms (WT)-1, antígeno carcinoembrionario (CEA) y PR-1. En la técnica se conocen también otros antígenos tumorales adicionales (por ejemplo, ver Novellino *et al.*, *Cáncer Immunol. Immunother.* 54(3): 187-207, 2005) y se describen a continuación. Los antígenos tumorales también se conocen como «antígenos del cáncer». El antígeno tumoral puede ser cualquier antígeno asociado a un tumor, bien conocido por el experto en la técnica, por ejemplo, el antígeno carcinoembrionario (CEA), gonadotropina coriónica β -humana, alfafetoproteína (AFP), AFP reactiva a la lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, transcriptasa inversa de telomerasa humana, RU1, RU2 (AS), esterasa carboxilo intestinal, mut hsp70-2, factor estimulante de colonias de macrófagos, prostasa, antígeno pro específico de estado (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, prosteina, PSMA, Her2/neu, survivina y telomerasa, antígeno tumoral de carcinoma de próstata 1, MAGE, ELF2M, elastasa de neutrófilos, efrinB2, CD22, factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF)-I, IGF-II, receptor de IGF-I y mesotelina. A continuación, se detalla una lista de antígenos tumorales seleccionados y sus tumores asociados.

Ejemplos de tumores y sus antígenos tumorales

Tumor	Antígenos objetivo asociados con el tumor
Leucemia mielógena aguda	Tumor de Wilms 1 (WT1), PRAME, PR1, proteinasa 3, elastasa, catepsia G
Leucemia mielógena crónica	WT1, PRAME, PR1, proteinasa 3, elastasa, catepsia G
Síndrome mielodisplásico	WT1, PRAME, PR1, proteinasa 3, elastasa, catepsia G
Leucemia linfoblástica aguda	PRAME
Leucemia linfocítica crónica	Superviviente
Linfoma no Hodgkiniano	Superviviente
Mieloma múltiple	NY-ESO-1
Melanoma maligno	MAGE, MART, Tirosinas a, PRAME GP100
Cáncer de pecho	WT1, Herceptin, antígeno de tumor epitelial (ETA)
Cáncer de pulmón	WT1
Cáncer de ovario	CA-125
Cáncer de próstata	PSA
Cáncer pancreático	CA19-9, RCAS1
Cáncer de colon	CEA
Cáncer de cuello uterino	SCC, CA125, CEA, Citoqueratinas (TPA, TPS, Cyfra21-1)
Carcinoma de células renales (RCC)	Factor de crecimiento fibroblástico 5
Tumores de célula germinal	AFP

15 En algunas realizaciones, el ensayo es para detectar una infección con un patógeno en un sujeto con inmunidad comprometida. Los sujetos con inmunidad comprometida son más susceptibles a infecciones oportunistas, por ejemplo, infecciones por virus, hongos, protozoos, o infecciones bacterianas, enfermedades priónicas, y determinados neoplasmas. Entre quienes se pueden considerar con inmunidad comprometida se incluyen, entre otros, sujetos con SIDA (o seropositivos), sujetos con inmunodeficiencia severa combinada (SCID), diabéticos, sujetos que han sufrido trasplantes y que estén tomando inmunosupresores, y aquellos que están recibiendo quimioterapia para el cáncer.

20 Los individuos con inmunidad comprometida también incluyen sujetos con la mayoría de tipos de cáncer (a excepción del cáncer de piel), anemia de células falciformes, fibrosis quística, aquellos que no tienen bazo, sujetos con enfermedad renal en estado terminal (diálisis), y aquellos que han estado tomando corticoides de forma habitual en pastillas o mediante inyecciones durante el último año.

25 Los sujetos con problemas graves de hígado, pulmón o enfermedad cardíaca también pueden tener inmunidad comprometida.

30 En otras realizaciones, el sujeto con inmunidad comprometida está infectado con un lentivirus. Los lentivirus incluyen, entre otros, virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2), virus de la inmunodeficiencia de simios agm (SIVagm), virus de la inmunodeficiencia de simios mnd (SIVmnd), virus de la inmunodeficiencia de simios syk (SIVsyk), virus de la inmunodeficiencia de simios col (SIVcol), virus Visna-Maedi (VMV), virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV), virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), virus de la artritis y encefalitis de las cabras (CAEV) y virus de la anemia infecciosa equina (EIAV). En algunas realizaciones, el lentivirus es un virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). En algunas realizaciones, el

lentivirus es un virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2). Se contempla la posibilidad de que el antígeno patógeno pueda ser un extracto del patógeno, o una proteína sintética o un fragmento de péptido, o fragmentos sintetizados de una partícula antigénica del patógeno con solapamiento de la secuencia nudeótida o de aminoácido.

5 En algunas realizaciones, el método incluye además la detección de un conjunto específico de células inmunitarias como linfocitos B o T.

10 En una realización, el método incluye evaluar la captación o el API de linfocitos B. En este ejemplo, el API está positivamente correlacionado con la expresión CD154 de linfocitos T y B estimulados con el virus de la hepatitis o sus fragmentos. Un API superior a 1 (captación de hepatitis B/fragmento/péptido > captación del antígeno de referencia) indica que un sujeto tiene un mayor riesgo de infección o presencia de hepatitis B. De forma alternativa, si se supera un número mínimo de linfocitos B, que componen la hepatitis B, entonces la persona tiene un mayor riesgo de contraer la hepatitis B.

En algunos ejemplos, la pluralidad de biomarcadores incluye uno o más marcadores para uno o más de los patógenos enumerados más arriba.

15 En otros ejemplos, se describe un ensayo global que permite diagnosticar o predecir el rechazo del órgano trasplantado como se describe en detalle en la sección III en combinación con el diagnóstico o predicción de la infección por patógenos, como una infección viral o bacteriana. Por ejemplo, se utilizan marcadores específicos, conocidos por el experto en la técnica para detectar un virus y/o infección bacteriana determinado y se utilizan al menos marcadores CD27, IgM, IgA, IgG, IgD, CD5 y CD 10 para diagnosticar o predecir el rechazo del órgano trasplantado. Se contempla la posibilidad de que también se puedan detectar biomarcadores adicionales, como marcadores de células de memoria adicionales (*por ejemplo*, IgG), CD19, CD38 (marcador de células plasmáticas) y CD138 (marcadores de activación de células plasmáticas), CD154 (marcador de activación de linfocitos B), CTLA4 (marcador co-estimulador de linfocitos B negativos) y CD45 (marcador de panleucocitos/linfocitos). En un ejemplo, cualquiera de los marcadores fenotípicos que aquí se describen se utiliza solo o de forma combinada.

25 En algunas realizaciones, se miden los niveles de expresión de la pluralidad de biomarcadores utilizando citometría de flujo u otros métodos conocidos por el experto en la técnica, incluyendo aquellos que se describen en el presente documento (ver sección III y ejemplos).

La divulgación se ilustra también mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

30 **Ensayo de supervisión del rechazo de linfocitos B**

Este ejemplo describe un ensayo de supervisión del rechazo de linfocitos B para identificar los receptores en riesgo de ACR y HR.

35 En estos conjuntos de datos, el receptor propenso al rechazo se etiquetó como “rechazante” y el receptor que no experimentó rechazo como “no rechazante”. Un API significativamente más alto distinguió sin solapamiento (100% de sensibilidad y especificidad) a los niños que experimentaban un rechazo comprobado por biopsia (rechazantes) tras el trasplante de hígado (LTx) o intestino delgado (SBTx), de aquellos que no experimentaron rechazo (no rechazantes). (Tabla 1). (Tabla 1).

Tabla 1

LTx	API (Media ±SEM)	SBTx	API (Media ±SEM)
NR n=20	0,750± 0,048	NR n=18	0,555 ±0,060
R n=15	1,794± 0,506	R n=11	1,781 ±0,255
valor p	0,0030	valor p	0,0003

40 Los datos adicionales mostraron que los diferentes tipos de receptores de trasplantes mostraron resultados similares. Por ejemplo, se observaron resultados similares en todos los compartimentos de linfocitos B, excepto el compartimento IgG-i-. Estos subconjuntos, excluyendo los subconjuntos IgG-i- se definen por la presencia o ausencia de CD27, IgM, IgA, IgD, CD5 y CD 10. Las cantidades mínimas de marcadores inducen CD19 o CD20 para etiquetar una célula como linfocito B, IgG y CD27 para determinarlo como linfocito B de memoria, IgM o IgD para determinarlo como linfocito B naive. Estos estudios proporcionan respaldan el uso del API para diagnosticar el ACR y el HR y medir su riesgo.

50 El API produjo una correlación positiva significativa con linfocitos B inflamatorios específicos del donante, que expresaron el marcador inflamatorio CD154 (CD154+TcM aloespecifico) (linfocitos B CD154+ aloespecificos). Estas correlaciones se vieron en poblaciones receptoras de trasplantes de hígado o de intestino delgado (Tablas 2 y 3). Se observaron resultados similares en todos los compartimentos de linfocitos B excepto el compartimento IgG-i-. Estos subconjuntos, excluyendo los subconjuntos IgG-i- se definieron por la presencia o ausencia de CD27, IgM, IgA, IgD,

CD5 y CD10.

Tabla 2. Correlaciones para la captación de antígeno donante de linfocitos B (API) con linfocitos B de memoria citotóxicos T CD 154+ y CTLA-4+ en receptores de trasplantes de hígado.

n=14NR, 10R	CD19+B-células
CD154:+TcM (Spearman r)	0,5600
valor p	0,0044
CTLA4+TcM (Spearman r)	-0,5316
valor p	0,0090
CD154:+CD19 (Spearman r)	0,6246
valor p	0,0019
CTLA4+CD19 (Spearman r)	-0,6084
valor p	0,0027

5 **Tabla 3.** Correlaciones para la captación de antígeno donante de linfocitos B (API) con linfocitos B de memoria citotóxicos T CD 154+ y CTLA-4+ en receptores de trasplantes de intestino delgado.

n=17NR, 14R	CD19+B-células
CD154:+TcM (Spearman r)	0,7855
Valor p	0,00000017
CTLA4+TcM (Spearman r)	-0,3931
valor p	0,0349
CD154:+CD19 (Spearman r)	0,4347
valor p	0,0145

10 El API tenía una correlación negativa significativa con linfocitos de memoria citotóxica T específicos del donante antiinflamatorios que expresan el marcador antiinflamatorio CTLA4 (CTLA4+TcM aloespecífico). CTLA4+TcM se midieron en una mezcla de respuesta leucocitaria (MLR). CTLA4+TcM también se pudieron medir en el mismo estudio como el API, extendiendo la incubación de 40 minutos a 6-8 horas. Estas correlaciones se vieron en las poblaciones receptoras de trasplante de hígado o intestino delgado (Tablas 2 y 3). En los datos adicionales se pudo ver que todos los tipos de receptores de trasplantes mostrarían resultados similares. Se observaron resultados similares en todos los compartimentos de linfocitos B, excepto el compartimiento IgG-i-. Estos subconjuntos, 15 excluyendo los subconjuntos IgG+ se definieron por la presencia o ausencia de CD27, IgM, IgA, IgD, CD5 y CD.

El compartimiento de memoria IgG+ de linfocitos B fue menos eficiente en la presentación de antígeno donante en presencia de rechazo humoral, lo cual podía producirse aisladamente o con rechazo celular agudo. En contraste, el API de los compartimentos de linfocitos B naive como los compartimentos de IgD+, o los compartimentos de IgD+CD27- siguió mostrando un API >1 cuando el ACR está presente sin HR.

20 Estas observaciones se pueden utilizar para distinguir entre HR y ACR. Por ejemplo, el API de linfocitos B IgG+ (memoria) se expresa como una relación con el API de linfocitos B IgD+ naive. Efectivamente, esta relación es también una medida de captación de antígeno donante por los linfocitos B IgG+ de memoria, en relación con la captación de antígeno donante por los linfocitos B IgD+ naive. La memoria resultante: la relación del API del linfocito B naive es <1 si el rechazo humoral se encontró solo o con ACR y >1 si solo está presente el ACR sin HR.

25 Estos estudios respaldan el uso del ensayo descrito utilizando un API para diagnosticar el ACR y el HR, además de medir su riesgo.

Ejemplo 2

Ensayo de supervisión del trasplante de órganos

Este ejemplo describe un ensayo para la identificación de los receptores en riesgo de ACR y HR en el cual se

proporcionan las siguientes indicaciones: (1) el análisis de linfocitos B que componen el antígeno donante; (2) la caracterización de la alorespuesta de los linfocitos B (*por ejemplo*, si es inflamatoria o anti-inflamatoria), y la caracterización de la alorespuesta de los linfocitos T de memoria citotóxica (*por ejemplo*, ya sea inflamatoria o anti-inflamatoria).

5 El API de linfocitos B, sus compartimentos de memoria y naive y la producción resultante de CD154 y CTLA4 en linfocitos T y B, que se describen en el Ejemplo 1 se combinan en una sola prueba de 6-8 horas, en la que el donante etiquetado con colorante y el antígeno tercero actúan como estimuladores. La citometría de flujo policromática se utiliza para medir la presentación de antígenos de linfocitos B, y la alorespuesta inflamatoria o anti-inflamatoria de linfocitos B y T simultáneamente. Este ensayo combinado proporciona un análisis completo de los
10 linfocitos B, captan el antígeno donante, el carácter de la alorespuesta del linfocito B, ya sea inflamatoria o anti-inflamatoria, y la alorespuesta de linfocitos T de memoria citotóxica, ya sea inflamatoria o anti-inflamatoria.

Ejemplo 3

Ensayo de presentación de antígeno de linfocito B

15 El ejemplo presenta un ensayo de presentación de antígeno de linfocitos B para detectar el riesgo de rechazo en sujetos con un órgano trasplantado.

Sistema de ensayo: Los linfocitos obtenidos de un receptor de trasplante se mezclaron con antígeno donante o antígeno tercero. El antígeno tercero incluía los antígenos de un individuo antigénicamente diferente al receptor o al donante. La similitud o la disimilitud antigénica se determinó en los loci HLA. Estos loci de histocompatibilidad incluían los loci de clase I principales (*por ejemplo*, HLA-A, -B y -C) y de clase II (*por ejemplo*, HLA-DR, -DP, -DQ, -DOA, -DOB y -DM). Si el antígeno donante real no estaba disponible, se utilizaron antígenos de sujetos humanos normales que se hicieron corresponder con los donantes reales en los loci HLA. El API fue la relación de presentación y captación de antígeno donante con respecto a antígeno tercero. Si la presentación de antígeno donante superó esto debido al tercero, el API fue generalmente >1 y el individuo tenía un mayor riesgo de rechazo. Si la presentación de antígeno donante fue superada por el antígeno tercero, el API es generalmente < 1 y el individuo tiene un menor riesgo de rechazo. Como se muestra en la FIG. 1, en el rechazante (paneles superiores), el 23,6% de los linfocitos B receptores presentó antígeno donante (panel superior central), en comparación con el 4,8% de linfocitos B receptores que presentaron antígeno tercero (panel superior derecho) para un API de 4,91. En el caso del no rechazante (paneles inferiores), el 35,9% de los linfocitos B receptores presentó el antígeno tercero (panel inferior derecho), pero solo el 13,3% presentó antígeno donante (panel central inferior). El API es de 0,037 en este sujeto no rechazante.

La captación y presentación de antígenos se midió colocando antígeno donante o tercero en contacto o bien con linfocitos B purificados o leucocitos de sangre periférica (PBL) del receptor. Posteriormente, se utilizaron técnicas de imagen (como la citometría de flujo, o diversas técnicas microscópicas, *por ejemplo*, microscopía confocal) para medir el antígeno que ha sido recogido por el linfocito B.

35 Las tablas 4-7 resumen las diferencias en el API entre los rechazantes y los no rechazantes para algunos de los subconjuntos de linfocitos B en niños que habían recibido un trasplante de hígado (Tabla 4) o de intestino (Tabla 5), o la población combinada de trasplantes de hígado o de intestino (Tabla 6) y receptores de trasplantes renales adultos (Tabla 7). Los linfocitos B se identificaron con el marcador CD19. Los subconjuntos de linfocitos B se etiquetaron con CD27, un marcador de memoria, e IgG+ otro marcador de memoria de linfocitos B. Se incluyó una medición por sujeto, realizada o bien cerca de un rechazo comprobado por biopsia (estado del rechazante) o de una ausencia de rechazo establecida (estado del no rechazante). Dentro de la cohorte del trasplante de hígado, o intestino, algunos sujetos solo fueron sometidos a una medición, y otros habían sido monitorizados en serie antes del trasplante, y 1 a 60 días y 61 a 200 días después del trasplante. La única medición de pacientes con trasplante de hígado o intestino monitorizados en serie que se ha incluido en las Tablas 4-6 fue la que se realizó durante el
45 período de 1 a 60 días después del trasplante.

Tabla 4. Diferencias en el índice de presentación de antígenos (API) media \pm SEM entre no rechazantes y rechazantes tras el trasplante de hígado. (Leyenda: linfocito B = CD 19+, linfocito B de memoria = CD19+CD27+, linfocito B naive = CD19+CD27-, linfocito B de memoria IgG+ = CD19+IgG+, linfocito B IgG naive = CD19+IgG-.)

Resultado	CD 19+	CD19+CD27+	CD19+CD27-	CD19+IgG+	CD19+IgG-
No rechazantes (n=34)	0,512 \pm 0,057	0,589 \pm 0,083	0,433 \pm 0,177	0,843 \pm 0,108	0,738 \pm 0,305
Rechazantes	1,794 \pm 0,237	1,411 \pm 0,243	1,738 \pm 0,710	1,303 \pm 0,151	1,703 \pm 0,317
valor p	3,12E-07	0,0006	0,0015	0,011	0,005

Tabla 5. Diferencias en el índice de presentación de antígenos (API) media \pm SEM entre no rechazantes y rechazantes tras el trasplante de intestino. (Leyenda: ver Tabla 4).

Resultado	CD 19+	CD19+CD27+	CD19+CD27-	CD19+IgG+	CD19+IgG-
No rechazantes (=34)	0,601 \pm 0,048	0,660 \pm 0,072	0,546 \pm 0,097	0,620 \pm 0,133	0,553 \pm 0,067
Rechazantes (n=22)	1,94 \pm 0,427	1,386 \pm 0,218	2,586 \pm 0,957	0,968 \pm 0,396	2,333 \pm 0,980
valor p	4,38E-05	0,0001	0,001	0,042	0,014

- 5 **Tabla 6.** Diferencias en el índice de presentación de antígenos (API) media \pm SEM entre no rechazantes y rechazantes en la población combinada de receptores de trasplantes de hígado o intestino que se muestra en las Tablas 4 y 5. (Leyenda: ver Tabla 4).

Combinado	CD 19+	CD19+CD27+	CD19+CD27-	CD19+IgG+	CD19+IgG-
No rechazantes (n=68)	0,543 \pm 0,037	0,625 \pm 0,054	0,477 \pm 0,100	0,677 \pm 0,088	0,608 \pm 0,141
Rechazantes (n=48)	1,79 \pm 0,235	1,411 \pm 0,164	2,058 \pm 0,578	1,208 \pm 0,197	1,898 \pm 0,470
valor p	2,86E-10	2,21E-07	4,1E-06	0,002	0,0002

- 10 **Tabla 7.** Diferencias en el índice de presentación de antígenos (API) media \pm SEM de linfocitos B CD19+ entre no rechazantes y rechazantes tras el trasplante renal.

Combinado	CD 19+API
No rechazantes (n=10)	0,624 \pm 0,14
Rechazantes (n=7)	1,49 \pm 3,6
valor p (una cola)	0,039

- 15 A continuación, se evaluó el resultado del ensayo con pruebas de sensibilidad y especificidad utilizando la serie de datos ilustrativos que se resume en las Tablas 4-6 para niños con un trasplante de hígado (Tabla 4) o intestino (Tabla 5) o la cohorte combinada de receptores de trasplante de hígado o intestino (Tabla 6). La sensibilidad fue la proporción de rechazantes con un API que superaba el umbral de riesgo de rechazo. La especificidad fue la proporción de no rechazantes con un API por debajo del umbral de riesgo de rechazo.

- 20 Los umbrales de riesgo de rechazo se identificaron y probaron para cada población de sujetos utilizando la regresión logística y la realización de pruebas de replicación de cribado. Los receptores de hígado que aparecen en la Tabla 4 se dividieron en una cohorte de cribado de 43 receptores en los cuales estaba disponible una sola medición del API (transversal) en proximidad con un rechazo comprobado por biopsia o un curso de no rechazante establecido. La sensibilidad y especificidad de este umbral fue luego confirmada en 17 receptores de hígado restantes determinados como una cohorte de replicación, en la cual se realizaron mediciones API longitudinalmente, antes del trasplante y en 1-60 y 61-200 días después de un trasplante hepático. Con fines de replicación, se volvió a realizar una prueba de sensibilidad y especificidad del umbral de riesgo de rechazo identificado en la cohorte de cribado utilizando los datos previos al trasplante y el API de 1-60 días.

- 25 De forma similar a los receptores de hígado, los pacientes de trasplante de intestino que se resumen en la Tabla 5 se componían de 45 receptores supervisados transversalmente que componían la cohorte de cribado, y los 11 receptores restantes supervisados longitudinalmente, que componían la cohorte de replicación.

- 30 La tabla 8 muestra a continuación los umbrales de riesgo de rechazo para la presentación de antígeno de linfocito B (linfocitos CD19+) derivados de receptores de un hígado, receptores de un intestino y la población combinada que compone las cohortes de cribado (transversales) respectivas. Los umbrales en o por encima de lo que se predijo en el estado del rechazante de hígado, intestino o cohortes de cribado combinadas fueron de 1,115, 1,115 y 1,108, respectivamente. La sensibilidad y especificidad de estos umbrales se confirmó en las respectivas cohortes de replicación, para dos de las tres mediciones API longitudinales, el API anterior al trasplante y el API después del trasplante a 1-60 días. Para cada valor de sensibilidad, las cifras de rechazantes identificados correctamente, por ejemplo, en la tabla se muestran 11 de 13 receptores de hígado con un API \geq 1,115. Asimismo, también aparece el número de no rechazantes identificados con un API por debajo del umbral de riesgo de rechazo.

Tabla 8. Resumen de las pruebas de sensibilidad y especificidad del API del umbral de riesgo de rechazo en niños con trasplante de hígado o intestino o la población combinada

Cohorte de cribado				
		API del umbral	Sensibilidad	Especificidad
API en sección transversal	Hígado	$\geq 1,115$	84,6% (11 de 13)	96,7% (29 de 30)
	Intestino	$\geq 1,115$	100% (15 de 15)	96,7% (29 de 30)
	Combinado	$\geq 1,108$	92,9% (26 de 28)	96,7% (58 de 60)
Cohorte de replicación				
		API del umbral	Sensibilidad	Especificidad
API antes de trasplante	Hígado	$\geq 1,115$	87,5% (7 de 8)	100% (2 de 2)
	Intestino	$\geq 1,115$	100% (3 de 3)	100% (3 de 3)
	Combinado	$\geq 1,108$	90,9% (10 de 11)	100% (5 de 5)
		API del umbral	Sensibilidad	Especificidad
API 1-60 días después del trasplante	Hígado	$\geq 1,115$	100% (13 de 13)	100% (4 de 4)
	Intestino	$\geq 1,115$	100% ((7 de 7)	100% (4 de 4)
	Combinado	$\geq 1,108$	100% (20 de 20)	100% (8 de 8)

La naturaleza dinámica del API en el mismo individuo se ilustró para 28 niños que habían sido monitorizados en serie, antes del trasplante, y en los días 1-60 y 61-200 después del trasplante de hígado o intestino (FIG. 2). Estos resultados muestran que los rechazantes (que experimentan un rechazo dentro de los primeros 60 días después del trasplante) muestran un mayor riesgo de rechazo en la forma de un API en o por encima del API $\geq 1,11$ del umbral de riesgo de rechazo antes del trasplante. Los rechazantes también muestran un mayor riesgo de rechazo durante el período propenso al rechazo de 1-60 días, pero muestran una reducción en el riesgo de rechazo caracterizada por un API $< 1,11$ durante la última parte del seguimiento. En contraste, la mayoría de los no rechazantes son propensos a mostrar un menor riesgo de rechazo caracterizado por un API $< 1,11$ pre-trasplante, que es probable que persista a lo largo del transcurso post-trasplante.

Una de las ventajas del ensayo presentador de antígeno de linfocito B es su capacidad para utilizar un antígeno «donante subrogado» en lugar del antígeno donante real. El antígeno donante real se compone de leucocitos de sangre periférica o células del bazo llamadas esplenocitos que se obtienen del donante y se consumen durante las pruebas de tipificación de tejidos requeridas en cada uno de los muchos centros que reciben los distintos órganos de un donante para trasplante. Por tanto, no es posible realizar una prueba permanente utilizando células donantes reales. Un estudio ilustrativo que se resume en la FIG. 3 muestra que si se ha utilizado el antígeno donante real o si se utiliza el antígeno donante subrogado, la asignación de rechazante o del estado de rechazante no cambia si se utiliza un umbral de riesgo de rechazo de 1,115. En este estudio se han realizado pruebas simultáneamente en 4 no rechazantes y 2 rechazantes usando estimuladores de donante real y de donante subrogado. Para cada receptor, se utilizó el mismo estimulador tercero para calcular el API con el estimulador de donante real o donante subrogado.

Aunque esta divulgación se ha descrito poniendo el énfasis en realizaciones específicas, será evidente para el experto en la técnica que se pueden utilizar variaciones de realizaciones específicas, y se pretende que la divulgación se pueda practicar de un modo distinto al descrito específicamente en el presente documento. Las funciones, características, compuestos o ejemplos descritos junto con un aspecto determinado, realización o ejemplo de la invención se entiende que son aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo de la invención. En consecuencia, esta divulgación incluye todas las modificaciones que se encuentran dentro del alcance de la divulgación según se define en las siguientes reivindicaciones. Por tanto, reivindicamos como nuestra invención todo lo que se encuentra dentro del alcance de estas reivindicaciones.

30

REVINDICACIONES

1. Un método para la evaluación del rechazo celular agudo (ACR) y/o rechazo humoral (HR) en un sujeto, que comprende:
- 5 la determinación *in vitro* de un índice presentador de antígeno comparando la captación de un antígeno donante con la captación de un antígeno tercero en una muestra biológica compuesta por células presentadoras de antígenos (APCs) obtenida del sujeto,
- donde el índice presentador de antígeno es una medida de la captación del antígeno donante en las APCs de la muestra, expresado como una relación con la captación del antígeno tercero en las APCs del sujeto, en donde la captación es la unión o internalización de antígeno por la APC,
- 10 donde el índice presentador de antígeno superior a uno predice con una sensibilidad de al menos el 90% y una especificidad de al menos el 90% un mayor riesgo de ACR y/o HR o la presencia de ACR y/o HR, y en el que las APCs son linfocitos B.
2. El método de la reivindicación 1, donde la determinación *in vitro* del índice presentador de antígeno comprende
- 15 (i) poner en contacto una primera parte de la muestra biológica compuesta por células presentadoras de antígeno (APCs) obtenida de un sujeto que necesita o que ha recibido un trasplante de órganos de un donante con un antígeno donante de un donante en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno donante; (ii) poner en contacto una segunda porción de la muestra biológica compuesta por APCs obtenida del sujeto que necesita o que ha recibido un trasplante de órgano con un antígeno tercero en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno tercero; y (iii) determinar la relación de captación del antígeno donante en la primera porción de la muestra biológica con la captación del antígeno tercero en la segunda porción de la muestra biológica, donde las APCs son linfocitos B.
- 20 3. El método de la reivindicación 2, donde la comparación de la captación de un antígeno donante con la captación de un antígeno tercero comprende (i) detectar una pluralidad de biomarcadores después del tratamiento del antígeno donante con la primera porción de la muestra biológica y el antígeno tercero con la segunda porción de la muestra biológica, en donde la pluralidad de biomarcadores incluye al menos CD27, IgM, IgA, IgD, IgG, CD5 y CD10; y (ii) comparar la pluralidad de biomarcadores detectados después del tratamiento con antígeno donante con los detectados después del tratamiento con el antígeno tercero para determinar el índice presentador de antígeno.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, donde la comparación de la captación de antígeno donante con la captación de antígeno tercero comprende además el etiquetado del antígeno donante y el antígeno tercero con una molécula fluorescente.
- 30 5. El método de la reivindicación 4, en donde la molécula fluorescente es éster de carboxifluoresceína succinimidil.
6. El método de la reivindicación 5, donde los niveles de expresión de la pluralidad de biomarcadores se miden utilizando un citómetro de flujo.
- 35 7. El método de cualquier reivindicación anterior, donde el método se utiliza para diagnosticar o predecir la enfermedad de injerto contra huésped.
8. El método de la reivindicación 7, donde el método se utiliza para diagnosticar o predecir la enfermedad de injerto contra huésped después de un trasplante de órganos sólidos, médula ósea o células madre, o una combinación de los mismos.
- 40 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el método se utiliza para predecir la inmunidad.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el método se utiliza para predecir la inmunidad a un autoantígeno, antígeno tumoral, antígeno patógeno o una combinación de los mismos.
11. El método de la reivindicación 10, donde el antígeno patógeno es un antígeno bacteriano, antígeno viral, antígeno fúngico, o una combinación de los mismos.
- 45 12. El método de cualquier reivindicación anterior, donde el sujeto es un receptor o un receptor candidato a un órgano sólido, médula ósea, células madre, o una combinación de los mismos.
13. El método de la reivindicación 12, donde el órgano es el hígado, el intestino, el riñón, el corazón, el pulmón, el páncreas, la piel o una combinación de los mismos.
14. El método de la reivindicación 12 o 13, donde el sujeto es un ser humano.
15. El método de la reivindicación 14, donde el sujeto es un niño.
- 50 16. El método de la reivindicación 1, para evaluar el rechazo de órganos, comprende:
- poner en contacto una primera muestra compuesta por células presentadoras de antígeno (APCs) obtenida de un sujeto que necesita o que ha recibido un trasplante de órganos con un antígeno donante de un donante en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno donante;

poner en contacto una segunda muestra compuesta por APCs obtenida del sujeto que necesita o que ha recibido un trasplante de órganos con un antígeno tercero en condiciones suficientes para inducir la captación del antígeno tercero; y

5 determinar un índice presentador de antígeno mediante la determinación de una relación de la captación del antígeno donante en la primera muestra con la captación del antígeno tercero en la segunda muestra, donde una relación superior a uno indica el rechazo de órganos, donde las APCs son linfocitos B.

17.El método de la reivindicación 16, donde el órgano es la médula ósea o un órgano sólido.

18.El método de la reivindicación 17, donde el órgano sólido se selecciona del grupo compuesto por hígado, intestino, riñón, corazón, pulmón, páncreas, piel y combinaciones de los mismos.

10 19.El método de la reivindicación 17, donde el sujeto es receptor de un órgano.

20.El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde el método se utiliza para valorar la inmunosupresión en el sujeto.

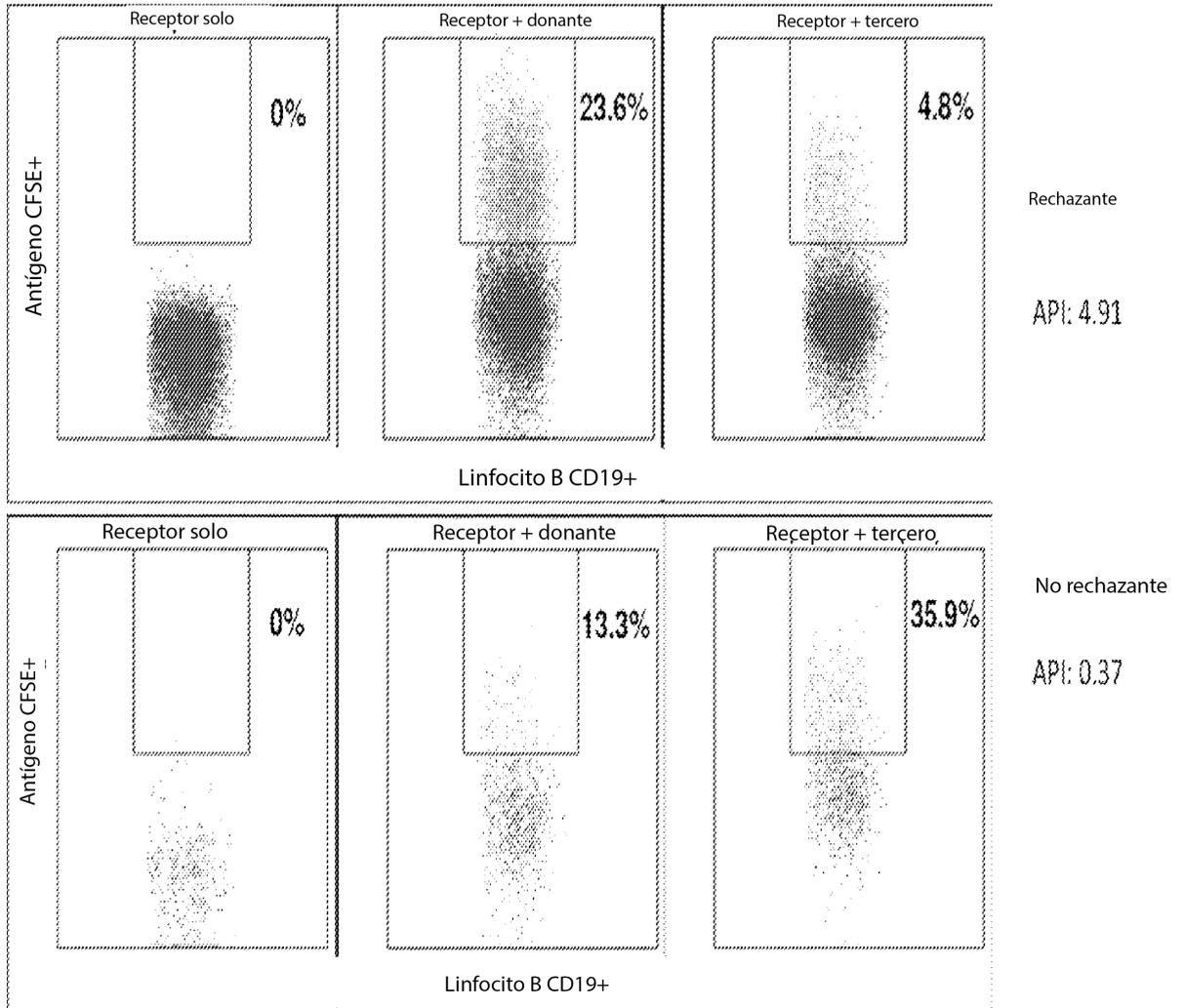
21.El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde el método se utiliza para demostrar la eficacia de una terapia inmunosupresora.

15 22.El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde el método se utiliza para evaluar el grado de rechazo.

23.El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde el antígeno donante o el antígeno tercero incluye células del donante, un péptido antigénico, un péptido antigénico etiquetado con una etiqueta detectable, como un fluorocromo, un ligando metálico o una combinación de los mismos.

20

FIG. 1



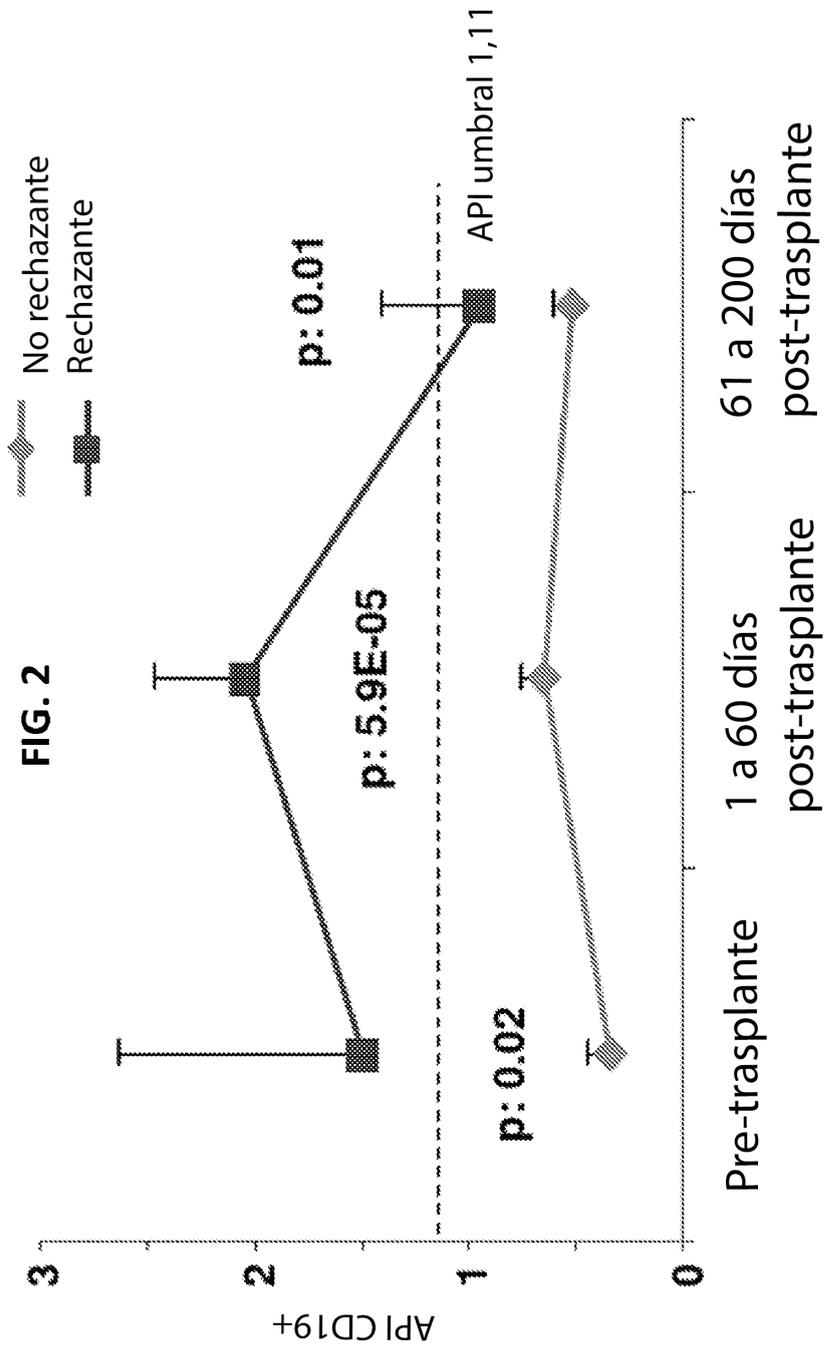


FIG. 3

