

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 840**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2015 PCT/EP2015/062517**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185697**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2015 E 15730984 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 3152572**

54 Título: **Método para detectar linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA**

30 Prioridad:

04.06.2014 EP 14382214

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.07.2019

73 Titular/es:

**INSTITUT D'INVESTIGACIÓ BIOMÈDICA DE BELLVITGE (IDIBELL) (100.0%)
Avda. Gran Via de L'Hospitalet 199, Hospital Duran I Reynals 3A PL
08908 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**BESTARD MATAMOROS, ORIOL;
LÚCIA PERREZ, MARC;
GRINYÓ BOIRA, JOSEP MARIA;
CRUZADO GARRIT, JOSEP MARIA y
TORRAS AMBROS, JOAN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 719 840 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

Método para detectar linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para detectar linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA en un sujeto y al uso de dichos métodos para determinar el riesgo de que un sujeto tenga un rechazo humoral contra un trasplante alogénico, para seleccionar un sujeto para recibir un trasplante y para determinar la presencia de sensibilización humoral frente a HLA.

Antecedentes de la invención

El rechazo humoral es la barrera inmunológica más difícil de superar en el alotrasplante en seres humanos. En la actualidad, ya sea en sus formas agudas o crónicas de presentación clínica, representa una de las etiologías más prevalentes de la pérdida de aloinjerto renal. Además, hoy en día, hasta casi el 40 por ciento de los pacientes en lista de espera para recibir un trasplante de riñón se consideran como alosensibilizados, es decir, con presencia detectable de anticuerpos circulantes contra antígenos HLA en la sangre periférica. Como consecuencia, la detección precisa de anticuerpos específicos de donante (DSA, de sus siglas en inglés) ha permitido a los médicos de trasplante una prevención óptima del rechazo temprano mediado por el anticuerpo post-trasplante en términos de establecer estrategias terapéuticas preventivas e incluso excluir a los pacientes sometidos a trasplante debido al riesgo de rechazo excesivo.

Dos poblaciones principales de linfocitos B que contribuyen al mantenimiento de la memoria inmunológica son las células plasmáticas de larga vida y los linfocitos B de memoria. Las células plasmáticas de larga vida residen principalmente en la médula ósea y segregan continuamente anticuerpos que actúan rápidamente sobre los microbios invasores. Los linfocitos B de memoria residen principalmente en tejidos linfoides periféricos y pueden, tras el reencuentro con el antígeno de cebado, diferenciarse en células secretoras de anticuerpos (ASC, de sus siglas en inglés) y así amplificar la respuesta de anticuerpos. Durante un proceso de sensibilización como el trasplante, el cuerpo produce células plasmáticas de larga vida y linfocitos B de memoria que proporcionan una memoria inmunológica. Convencionalmente, en el entorno de trasplante, las respuestas de linfocitos B se evalúan mediante la medición serológica de anticuerpos específicos contra antígenos de donante (DSA). De hecho, hay muchos inmunoanálisis que evalúan anticuerpos HLA circulantes específicos de donante, como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), ELISA, citometría de flujo o ensayos basados en Luminex. Sin embargo, aunque estos ensayos son valiosos para la determinación de DSA en la circulación, es probable que subestimen la magnitud de la respuesta inmunitaria humoral, ya que excluye la detección del conjunto de linfocitos B de memoria. De hecho, los linfocitos B de memoria pueden existir en ausencia de niveles de anticuerpos séricos detectables y su rápida diferenciación y producción de anticuerpos pueden ser de gran relevancia para una respuesta humoral protectora.

De hecho, existen diferentes situaciones patológicas en el entorno de trasplante renal en las que no se pueden encontrar anticuerpos anti-HLA de donante circulantes utilizando ensayos altamente sensibles a pesar de la fuerte evidencia clínica de alosensibilización humoral, por ejemplo, en pacientes en lista de espera para un trasplante renal posterior y que no muestran anticuerpos circulantes contra antígenos HLA contra aloantígenos de injerto previos, ni en receptores de trasplantes renales que muestran características histopatológicas de daño mediado por anticuerpos pero sin ninguna evidencia de DSA en sangre periférica. De hecho, estas características pueden ser evidentes debido a la eventual absorción de anticuerpos específicos de antígeno mediante el injerto de desajuste de HLA o debido a la baja inmunogenicidad antigénica de antígenos de donantes que desencadenan una estimulación transitoria de linfocitos B baja, lo que conduce a una liberación de anticuerpos indetectable. Cabe destacar que, estas condiciones biológicas tienen implicaciones clínicas relevantes, ya que un individuo considerado no sensibilizado por medio de aloanticuerpos circulantes detectables, podría mostrar, de hecho, una respuesta de linfocitos B de memoria específicos de antígeno muy fuerte, lista para generar una fuerte respuesta inmunitaria secundaria en caso de una exposición posterior a un antígeno HLA previamente reconocido. Por lo tanto, la detección y cuantificación de linfocitos B de memoria capaces de producir anticuerpos anti-HLA dirigidos por el donante en diferentes puntos temporales del entorno del trasplante (tanto antes como después) refinaría significativamente las herramientas actuales de monitoreo inmunitario de la respuesta aloinmunitaria efectora.

En este sentido, las situaciones clínicas relevantes en las que dicho ensayo proporcionaría información destacada desde la perspectiva clínica se podrían enumerar de la siguiente manera: (a) antes de la cirugía de trasplante para demostrar la falta de alosensibilización en pacientes que esperan un primer aloinjerto o posterior con o sin anticuerpos anti-HLA circulantes, (b) antes del trasplante en individuos sensibilizados bien conocidos en los que la especificidad y el grado de sensibilización (MFI o intensidad de fluorescencia media) varían mientras están en la lista de espera, (c) en pacientes sensibilizados que se someten a programas de desensibilización para demostrar una inhibición significativa no solo de DSA circulantes, sino también de la frecuencia de ASC específicas de donante después del tratamiento y, además, (d) después del trasplante de riñón en pacientes con lesiones histológicas críticas que sugieren un daño mediado por anticuerpos pero sin ninguna evidencia de anticuerpos anti-HLA que circulan en la sangre periférica.

Hasta el momento, los ensayos reproducibles que pretenden cuantificar el número de células que contribuyen a la producción de aloanticuerpos son escasos. Se ha publicado una tinción HLA-tetrámero de linfocitos B CD19+ (Mulder et al., J. Immunol. 2003, 171: 6599-6603) y desarrollada además por Zachary *et al.* (Zachary et al., Transplantation 2007, 83: 982-988; Zachary et al., Transplantation 2007, 83: 989-994) para la detección y enumeración de linfocitos B que albergan un receptor de linfocitos B específico de HLA, pero *per se* esta técnica no cuantifica los linfocitos B que son capaces de producir anticuerpos. Más recientemente, una técnica descrita anteriormente para estimar la frecuencia precursora de linfocitos B con especificidad para HLA se basó en un método de estimulación de cultivo de linfocitos B impulsado por CD40L que incluye complementos estandarizados y células que responden al tratamiento clasificadas de linfocitos B, seguido de una fase de visualización en formato ELISPOT con moléculas de HLA sintéticas como la matriz de detección (Mulder et al., Clin. Exp. Immunol. 2001, 124: 9-15; Heidt et al., A. Am. J. Transplant. 2012, 112(6): 1469-78). Sin embargo, este enfoque hace que no sea factible para la estandarización como se requeriría para una prueba clínica.

Por lo tanto, todavía existe una necesidad en la técnica de un método fiable y reproducible para determinar y cuantificar linfocitos B que sean capaces de producir anticuerpos dirigidos contra HLA.

Sumario de la invención

Los inventores de la presente invención han desarrollado un sistema para detectar y cuantificar linfocitos B de memoria que pueden producir y secretar anticuerpos específicos para HLA. En particular, los inventores han desarrollado un nuevo ensayo ELISPOT de linfocitos B que permite la determinación de la frecuencia de linfocitos B de memoria productores de anticuerpos específicos para HLA (ejemplo 1). Utilizando este ensayo, los individuos identificados como altamente sensibilizados contra múltiples antígenos específicos para HLA mediante la determinación de anticuerpos específicos para HLA en sangre periférica también exhiben una alta frecuencia de ASC específicas para HLA (Figuras 1 y 2). De forma interesante, este ensayo identifica pacientes que, a pesar de no tener evidencia de anticuerpos específicos de donante mediante LUMINEX antes del trasplante, tienen una alta frecuencia de ASC específicas de donante, y eventualmente experimentan rechazo mediado por anticuerpos (ABMR, de sus siglas en inglés) después del trasplante (figura 5). El ensayo también permite la detección de ASC específicas para HLA en pacientes en lista de espera para un aloinjerto de riñón posterior, incluso si estos pacientes no muestran anticuerpos circulantes específicos para HLA contra antígenos HLA no coincidentes del injerto anterior (figura 4).

Basándose en los hallazgos anteriores, se han desarrollado los siguientes aspectos inventivos.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para detectar linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA en un sujeto que comprende:

- i) estimular los linfocitos B de memoria en una muestra que contiene linfocitos B de memoria de dicho sujeto,
- ii) capturar los anticuerpos secretados por los linfocitos B de memoria estimulados de la etapa (i) con un anticuerpo específico para IgG o IgM,
- iii) poner en contacto los anticuerpos capturados en la etapa (ii) con al menos un multímero HLA de dicho HLA y
- iv) detectar el multímero HLA de dicho HLA unido a los anticuerpos capturados en la etapa (ii).

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el riesgo de que un sujeto tenga rechazo humoral después de un trasplante alogénico de órganos o tejidos que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA que utiliza el método del primer aspecto, en el que dicho HLA está presente en el órgano o tejido trasplantado o en el órgano o tejido que se va a trasplantar y en el que niveles aumentados de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para dicho HLA en relación con un valor de referencia son indicativos de que dicho sujeto tiene un alto riesgo de rechazo humoral.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el riesgo de que un sujeto sufra endarteritis asociado con un rechazo humoral postrasplante después de un trasplante alogénico de órganos o tejidos, que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA utilizando el método del primer aspecto, en el que dicho HLA está presente en el órgano o tejido trasplantado o en el órgano o tejido que se va a trasplantar y en el que niveles aumentados de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para dicho HLA en relación con un valor de referencia son indicativos de que dicho sujeto tiene un alto riesgo de sufrir endarteritis asociada con el rechazo humoral posterior al trasplante.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para seleccionar a un sujeto para recibir un trasplante alogénico de órganos o tejidos que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA utilizando el método del primer aspecto, en el que dicho HLA está presente en el órgano o tejido que se va a trasplantar y en el que el sujeto se selecciona para recibir dicho trasplante alogénico de órganos o tejidos si se detectan niveles disminuidos de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para dicho HLA en relación con un valor de referencia.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar la presencia de sensibilización humoral contra al menos un HLA en un sujeto que comprende detectar los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para dicho HLA utilizando el método del primer aspecto, en el que la detección de un linfocito B secretor de anticuerpos específico para dicho HLA es indicativa de que dicho sujeto tiene una sensibilización humoral contra dicho HLA.

En un sexto aspecto, la invención se refiere a un kit para detectar linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para dicho HLA en una muestra que comprende linfocitos B que comprenden un anticuerpo específico para IgG o IgM y al menos un multímero HLA.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Pocillos específicos para HLA representativos que utilizan el ensayo ELISPOT de linfocitos B de 3 pacientes sensibilizados diferentes. (a) Primer paciente que muestra un alto número de manchas de IgG contra A24:02, una respuesta de IgG policlonal y un control negativo contra el medio solo. (b) Un segundo individuo probado contra A2:01, la secreción de IgG policlonal y el medio. (c) Un tercer paciente de trasplante sensibilizado contra A11:01, medio y secreción de IgG policlonal.

Figura 2. Una gráfica representativa de un paciente con trasplante renal hipersensibilizado en lista de espera que muestra múltiples anticuerpos anti-HLA (con diferente intensidad de fluorescencia media, MFI) mediante Luminex (A01:01, A11:01, A24:02, B07:02, B27:05) en 2 puntos de tiempo diferentes (MFI de Ac I, MFI de Ac II) (a). Cada anticuerpo anti-HLA detectado en cualquier momento se tradujo en presencia de frecuencias de ASC específicas de Ag-HLA [(b), los resultados expresados en manchas de IgG específicas de HLA de donante (ds IgG-ASC) y (c) como la relación de ASC-IgG específicas para HLA de donante/ASC-IgG policlonal total (ds IgG-ASC/PolyIgG)].

Figura 3. Pocillos negativos representativos de una prueba ELISPOT de linfocitos B contra A24:02 y A11:01 en 2 pacientes que expresan dichos alelos HLA de clase I y muestran > 90 % de sensibilización contra anticuerpos reactivos frente a un grupo de antígenos (PRA, de sus siglas en inglés). La secreción de IgG policlonal se puede encontrar en estos pacientes como un control óptimo del ensayo de proliferación de ASC. El último panel muestra a un individuo sano y representativo que no muestra anticuerpos circulantes contra antígenos HLA evaluados mediante LUMINEX que no muestran ASC contra ningún antígeno HLA evaluado con el ensayo ELISPOT.

Figura 4. La Figura 4 muestra un paciente representativo que no muestra actualmente anticuerpos circulantes contra los antígenos HLA A11:01 y A24:02, que se expresaron en el aloinjerto renal anterior que este paciente había recibido y perdido 2 años antes, pero mostró frecuencias significativamente altas de ASC-IgG anti-A11:01 y anti-A24:02 específicas cuando se evaluó con el ensayo Elispot de linfocitos B [ambas manchas de IgG específicas para el antígeno HLA de donante (d-s IgG-ASC) y se expresaron mediante la relación de ASC-IgG específicas de HLA de donante/ASC-IgG policlonal total (d-s IgGASC/PolyIgG)].

Figura 5. Las Figuras 5a, 5b y 5c muestran a tres pacientes representativos de trasplante renal que experimentan ABMR con altas frecuencias de ASC específicas de donante contra los antígenos de donante A24:02, A01:01 y A11:01, respectivamente, antes y durante el proceso de rechazo (Los primeros 2 no tenían DSA circulantes evaluados mediante el ensayo LUMINEX antes del trasplante).

La **Figura 6** muestra a un paciente representativo de trasplante de riñón sometido a ABMR agudo. Aunque Luminex solo detectó 1 anticuerpo específico de donante (DSA) de clase I (anti-A24:02), el ensayo Elispot de linfocitos B es capaz de identificar una alta frecuencia de dichas ASC-IgG específicas de donante (anti-A24:02) pero también de otras ASC-IgG específicas de donante (anti-A02:01) que no se detectaron utilizando el enfoque Luminex (ambas manchas de IgG específicas de antígeno HLA de donante (d-s IgG-ASC) y se expresaron mediante la relación de ASC-IgG específicas de HLA de donante/ASC-IgG policlonales totales (d-s IgGASC/PolyIgG) contra A24:02 y A02:01).

Figura 7. Las frecuencias de ASC específicas de donante no siempre se correlacionan significativamente con la intensidad de fluorescencia media (MFI, de sus siglas en inglés) del anticuerpo específico de antígeno detectado (ASC-IgG específicas de Ag-HLA) evaluado mediante Luminex. Tal como se muestra, mientras que el paciente 1 (7A) muestra una correlación altamente positiva entre la MFI de cada anticuerpo de antígeno único y la frecuencia de cada ASC específica de antígeno, el paciente 2 (7B) no muestra dicha correlación en absoluto. Además, aunque todos los antígenos individuales se hubieran considerado positivos en el paciente uno (MFI > 2000), en el paciente 2 solo 1 de los 3 antígenos analizados se consideraron positivos a pesar de haber mostrado altas frecuencias detectables de ASC contra estos antígenos HLA.

Figura 8. (A) La frecuencia de ASC-IgG específicas de HLA se representó mediante la relación entre el número de manchas específicas de HLA sobre las manchas de IgG policlonales totales obtenidas en cada individuo. Dado que cada paciente tiene un número determinado de linfocitos B de memoria clonable que producen un número diferente de ASC-IgG después de la activación policlonal, la relación entre las manchas de IgG específicas de HLA sobre las manchas de IgG policlonales totales para cada paciente, parece ser un enfoque fiable para caracterizar mejor la proporción o mejora de un clon de ASC-IgG específicas de HLA dado dentro de la población global de ASC-IgG. Este método de enfoque permite comparaciones fáciles, cualitativas y cuantitativas, entre muestras y pacientes. (B) Figura ilustrativa de dos pacientes con trasplante renal altamente sensibilizados por HLA que muestran el número total de manchas de IgG policlonales, el número de manchas de IgG específicas de HLA, la relación entre cada ASC-IgG específica de HLA/ASC-IgG policlonal y los valores de MFI de cada anticuerpo circulante específico para HLA.

Figura 9. Se realizó un análisis de las características operativas del receptor de sensibilidad/especificidad para

evaluar la relación Elispot de linfocitos B anti-HLA de donante de corte más precisa (ASC-IgG específicas de donante/ASC-IgG policlonales) evaluada en el momento en que el ABMR agudo predice el advenimiento de lesiones vasculares agudas según la clasificación de puntuación de Banff. Tal como se muestra, 0,35 fue la relación de Elispot de linfocitos B específicos para HLA de donante más sensible (85,7 %) y específico (75 %) que predice la presencia de endarteritis (ABC = 0,893; $p = 0,011$; CI95 % (0,721-1).

Figura 10. Evaluación de las frecuencias de ASC-IgG específicas de HLA en pacientes altamente inmunizados y no inmunizados con HLA. (A) Gráficas representativas de Elispot de linfocitos B de HLA de 4 pacientes altamente inmunizados con HLA. Tal como se muestra, se observa un amplio intervalo de frecuencias de ASC-IgG HLA-sp (específicas para HLA) así como la relación de respuestas de ASC-IgG HLA-sp sobre ASC-IgG policlonales totales frente a los antígenos HLA de clase I y II dirigidos. Se pueden ver diferentes frecuencias de ASC-IgG policlonales para cada paciente. No se observaron frecuencias de ASC-IgG HLA-sp contra los propios antígenos de tipo HLA en ningún individuo. (B) Gráficas representativas de Elispot de linfocitos B de HLA de 2 pacientes no inmunizados con HLA y 2 pacientes sanos. Tal como se muestra, no se puede detectar evidencia de respuestas de ASC-IgG HLA-sp en sangre periférica a pesar de las fuertes frecuencias de ASC-IgG policlonales entre todos los individuos. Los diamantes grises representan el nivel de MFI de anticuerpos (eje Y izquierdo); los diamantes vacíos representan anticuerpos que se habrían considerado negativos después del umbral interno para una detección negativa o positiva en la plataforma Luminex (2000 MFI). Las columnas representan el número de manchas de IgG HLA-sp (gris claro), la relación de ASC HLA-sp/ASC-IgG policlonales (gris oscuro) o las manchas de IgG policlonales totales (columna puntiaguda) (eje Y derecho).

Figura 11. Correlación entre el nivel de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de anticuerpos en sueros y las frecuencias de ASC-IgG específicas para HLA. (A) Se observó una débil correlación positiva entre la relación de frecuencias de ASC-IgG HLA-sp/ASC-IgG policlonales y el nivel de MFI de anticuerpos ($r = 0,31$, $p = 0,001$). (B) No se observó correlación entre las ASC-IgG policlonales totales y la MFI ($p = \text{NS}$). Los puntos por encima o por debajo del límite de MFI 2000, representan valores que se habrían considerado positivos o negativos, respectivamente, siguiendo el umbral interno para una detección positiva o negativa en la plataforma Luminex (2000 MFI).

Figura 12. Las frecuencias de células secretoras de anticuerpos (ASC) HLA-sp pueden detectarse en pacientes sensibilizados contra antígenos HLA alojados en aloinjertos previos. Se detectaron frecuencias de ASC HLA-sp contra antígenos HLA expresados en aloinjertos de riñón previos en varios pacientes. Se encontraron respuestas de ASC HLA-sp en pacientes que habían sido trasplantados 3 años antes (pacientes #B, N.º 1) y también en 3 pacientes que recibieron el aloinjerto renal más de 20 años antes (pacientes #E hace 29 años, #G hace 27 años y #H hace 22 años). No obstante, en otros pacientes (pacientes #A y #F), no se pudieron detectar frecuencias en la sangre periférica.

Figura 13. Frecuencias de ASC-IgG específicas para HLA de pacientes con trasplante de riñón en el momento del ABMR y antes de recibir el aloinjerto de riñón. (A) Relación de las frecuencias de ASC-IgG HLA-sp/ASC-IgG policlonales específicas de donante en pacientes con trasplante de riñón en el momento del ABMR. Todos los pacientes mostraron un amplio intervalo de frecuencias de ASC alorreactivas d-s (específicas de donante) en sangre periférica. De forma interesante, en un paciente (p n.º 9), mientras que solo se detectó 1 DSA circulante (DR11:01), el Elispot de linfocitos B reveló la presencia de un clon de ASC d-s adicional que en realidad se había observado previamente en la circulación (DR11:01 y también A24:02). (B) Relación de frecuencias de ASC-IgG HLA-sp/ASC-IgG policlonales específicas de donante antes del trasplante en 10/16 pacientes con trasplante de riñón que desarrollaron ABMR agudo después del trasplante. Como se ilustra, una proporción importante de los pacientes evaluados ya tenían frecuencias de ASC d-s en circulación, la mayoría de ellas ajustadas a un claro proceso de sensibilización previo. Por el contrario, el único paciente sin respuesta de ASC d-s (paciente n.º 4) no tuvo acontecimientos de sensibilización previos, lo que sugiere una activación *de novo* de la inmunidad antihumoral de donante. Los diamantes negros representan el nivel de MFI de anticuerpos (eje Y izquierdo), los diamantes vacíos representan ASC específicas para HLA, es decir, los anticuerpos que se habrían considerado como negativos después del umbral interno para una detección negativa o positiva en la plataforma Luminex. Las columnas representan la relación de ASC HLA-sp/ASC-IgG policlonales (eje Y derecho).

Figura 14. Gráfica de análisis de componentes principales (PCA, de sus siglas en inglés) para la presencia o ausencia de lesiones de endarteritis en pacientes sometidos a ABMR. Cada punto representa a un paciente con respecto a los dos primeros componentes principales: alorreactividad de linfocitos B de memoria específicos de donante (alta o baja frecuencia, definida como mayor o menor que 0,35 de la relación ASC-IgG específica de donante/ASC-IgG policlonales) y si el paciente experimentó o no lesiones de endarteritis.

Figura 15. El proceso de estimulación de los linfocitos B de memoria circulantes que utilizan el agonista de TLR R848 y la IL-2 produce la misma cantidad de linfocitos B de memoria secretores de anticuerpos (ASC) y las frecuencias de ASC-IgG específicas para HLA si se utiliza una de las células mononucleares de sangre periférica total (PBMC, de sus siglas en inglés) o linfocitos B purificados. Las PBMC o linfocitos B purificados (con el agotamiento parcial de los linfocitos T; Heidt S et al. Am J Transplant 2012) de dos pacientes sensibilizados con HLA-A02:01 (P n.º 1 y P n.º 2) se estimularon con R848 e IL-2. Los resultados muestran que se obtuvo una frecuencia equivalente de ASC productoras de IgG específicas para HLA A02:01 cuando se utilizan linfocitos B purificados o PBMC

Figura 16. La estimulación de PBMC de tres días con un anticuerpo monoclonal CD40 permite la detección de células productoras de anticuerpos específicas para HLA. La utilización de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 e IL-2 permite la diferenciación de linfocitos B de memoria específicos para HLA circulantes a células secretoras de anticuerpos específicos para HLA después de un cultivo de 3 días. Los linfocitos B de memoria específicos para

HLA capaces de producir anticuerpos IgG específicos para HLA se detectan claramente utilizando el ensayo Elispot de linfocitos B para HLA después de un cultivo de diferenciación de linfocitos B de memoria de 3 días.

Descripción detallada de la invención

5

Método para detectar linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para un HLA

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para detectar linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA en un sujeto, en lo sucesivo en el presente documento primer método de la invención, que comprende:

10

- i) estimular los linfocitos B de memoria en una muestra que contiene linfocitos B de memoria de dicho sujeto,
- ii) capturar los anticuerpos secretados por los linfocitos B de memoria estimulados de la etapa (i) con un anticuerpo específico para IgG o IgM,
- 15 iii) poner en contacto los anticuerpos capturados en la etapa (ii) con al menos un multímero HLA de dicho HLA y
- iv) detectar el multímero HLA de dicho HLA unido a los anticuerpos capturados en la etapa (ii).

15

El término "linfocito B", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un tipo de linfocito que desempeña un papel importante en la respuesta inmunitaria humoral, a diferencia de la respuesta inmunitaria mediada por células, que está regulada mediante linfocitos T. Los linfocitos B se caracterizan por la presencia de un receptor de linfocitos B (BCR, de sus siglas en inglés) en su superficie externa que permite que el linfocito B se una a su antígeno específico. Las funciones principales de un linfocito B son (i) producir anticuerpos contra los antígenos específicos que reconoce, (ii) realizar el papel de las células presentadoras de antígenos (APC, de sus siglas en inglés) y (iii) desarrollarse eventualmente en linfocitos B de memoria después de la activación mediante la interacción con su antígeno afín. Los linfocitos B son un componente esencial del sistema inmunitario adaptativo. El término "linfocito B" incluye células plasmáticas de larga vida y linfocitos B de memoria. El término "linfocito B plasmático de larga vida", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un subtipo de linfocitos B que residen principalmente en la médula ósea y secretan anticuerpos de manera continua. El término "linfocito B de memoria", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un subtipo de linfocitos B que se forman después de una infección y activación primaria mediante la interacción con su antígeno afín, que residen principalmente en tejidos linfoides periféricos y, tras el reencuentro con el antígeno de cebado, se diferencian en células secretoras de anticuerpos (ASC) amplificando así la respuesta del anticuerpo. En una realización preferida, el linfocito B es un linfocito B de memoria.

20

25

30

El primer método de la invención detecta linfocitos B secretores de anticuerpos, es decir, linfocitos B que son capaces de producir y secretar anticuerpos.

35

El término "HLA" o "antígeno leucocitario humano", como se utiliza en el presente documento, se refiere a los principales antígenos de histocompatibilidad (MHC, de sus siglas en inglés) de los seres humanos, que están codificados por los genes que se encuentran en el locus que forma el sistema HLA. El MHC es un conjunto de moléculas de superficie celular codificadas por una gran familia de genes en vertebrados. Las moléculas MHC muestran en la superficie celular una fracción de una proteína o epítipo, que puede ser del fenotipo del propio hospedador o de otras entidades biológicas.

40

El sistema HLA es el nombre del locus de genes que codifican dichos antígenos HLA en seres humanos. El superlocus contiene una gran cantidad de genes relacionados con la función del sistema inmunitario en los seres humanos. Este grupo de genes, que reside en el cromosoma 6, codifica proteínas presentadoras de antígenos de la superficie celular y tiene muchas otras funciones.

45

En una realización preferida, el HLA corresponde a MHC de clase I. En otra realización, los HLA corresponden a MHC de clase II. En otra realización, el HLA pertenece al tipo HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H, HLA-J, HLA-K, HLA-L, HLA-P, HLA-V, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB2-9, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DOA, HLA-DOB, MICA, MICB, TAP1, TAP2, y/o KIR.

50

El método de acuerdo con la invención permite la detección de células capaces de expresar cualquier anticuerpo específico para HLA siempre que se conozca el HLA y el HLA correspondiente se pueda proporcionar en forma multimérica. Las células adecuadas que se pueden detectar utilizando el método de la invención incluyen células que producen anticuerpos específicos para cualquiera de los HLA que se describen en la página web hla.alleles.org.

55

El sistema HLA es altamente polimórfico, ya que existen muchos alelos en cada locus individual.

60

En un procedimiento de trasplante, las moléculas de HLA actúan ellas mismas como antígenos y pueden provocar una respuesta inmunitaria en el receptor, lo que da como resultado un rechazo del trasplante. Cada célula humana expresa seis alelos MHC de clase I (un alelo HLA-A, -B y -C de cada progenitor) y de seis a ocho alelos MHC de clase 2 (un HLA-DP y -DQ, y uno o dos HLA-DR de cada progenitor y combinaciones de estos). La variación de HLA en la población humana es alta, al menos 350 alelos para los genes HLA-A, 620 alelos para HLA-B, 400 alelos para DR y 90 alelos para DQ. Cualquiera de dos individuos que no sean gemelos idénticos expresarán diferentes moléculas de

65

HLA. Todas las moléculas de HLA pueden mediar en el rechazo del trasplante, pero HLA-C y HLA-DP, que muestran un bajo polimorfismo, parecen ser las menos importantes. En un procedimiento de trasplante, las moléculas de HLA actúan ellas mismas como antígenos y pueden provocar una respuesta inmunitaria en el receptor, lo que da como resultado un rechazo del trasplante.

5 El término "linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un linfocito B, que secreta un anticuerpo que se une específicamente a un HLA, es decir, un anticuerpo que se une a un HLA y no muestra sustancialmente unión a otros HLA a menos que compartan los mismos determinantes antigénicos.

10 El término "sujeto", como se utiliza en el presente documento, se refiere a todos los seres humanos, hombres o mujeres, de cualquier edad o raza.

15 El método del primer aspecto comprende las siguientes etapas.

(i) *Estimular los linfocitos B de memoria en una muestra que contiene linfocitos B de memoria de dicho sujeto*

20 El término "muestra que contiene linfocitos B de memoria", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier muestra procedente del sujeto que contiene linfocitos B de memoria, por ejemplo, un fluido biológico como sangre, plasma, suero o linfa o una célula, tejido, órgano o porción del mismo que contiene linfocitos B de memoria como la médula ósea, el bazo o los ganglios linfáticos. En una realización particular, la muestra que contiene linfocitos B de memoria es una muestra de sangre periférica, preferentemente una muestra de sangre periférica que contiene células mononucleares de sangre periférica (PBMC). El término "sangre periférica" se relaciona con el volumen de sangre que circula lejos del corazón, es decir, la sangre que fluye a través del cuerpo de un sujeto. La muestra de sangre se puede obtener mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. El término "célula mononuclear de sangre periférica" o "PBMC" se refiere a cualquier célula sanguínea que tenga un núcleo redondo (a diferencia de un núcleo lobulado), como un linfocito, un monocito o un macrófago. Las PBMC se pueden extraer a partir de la sangre completa utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica. En otra realización particular, la muestra que contiene linfocitos B de memoria es una muestra que contiene linfocitos B purificados. Los linfocitos B se pueden purificar de la sangre completa por medio de métodos que son convencionales para el experto, como, por ejemplo, el método descrito en Heidt et al., 2012 (citado *supra*).

35 La expresión "que estimula", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la inducción de la diferenciación del linfocito B de memoria en una célula secretora de anticuerpos (ASC). Los términos que estimulan un linfocito B de memoria y que activan un linfocito B de memoria se utilizan indistintamente en el contexto de la invención.

40 La persona experta sabe cómo estimular un linfocito B de memoria para inducir su diferenciación en una ASC. Por ejemplo, un linfocito B de memoria se puede estimular y diferenciar en una ASC mediante la incubación de la muestra que contiene linfocitos B de memoria en presencia de IL-2 y un agonista de TLR, o alternativamente, mediante la incubación de la muestra que contiene linfocitos B de memoria en presencia de IL-2 y un anticuerpo anti-CD40.

45 El término "IL-2" o "interleucina 2", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína que es un miembro de una familia de citoquinas que también incluye IL-4, IL-7, IL-9, IL1-5 e IL-21. La IL-2 puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano, bovino, murino, equino, canino, etc. En una realización preferente, la IL-2 es la proteína humana con el número de acceso de UniProt P60568 (14 de mayo de 2014). La IL-2 se puede aislar de una fuente natural o producirse mediante métodos sintéticos o recombinantes.

50 La expresión "agonista de TLR", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula que es capaz de causar una respuesta de señalización a través de una vía de señalización de TLR, ya sea como un ligando directo o indirectamente a través de la generación de endógenos o exógenos. Los ligandos agonistas de los receptores TLR son (i) ligandos naturales del receptor TLR real, o variantes funcionalmente equivalentes de los mismos que conservan la capacidad de unirse al receptor TLR e inducir señales de coestimulación en el mismo, o (ii) un anticuerpo agonista contra el receptor TLR, o una variante funcionalmente equivalente del mismo capaz de unirse específicamente al receptor TLR y, más particularmente, al dominio extracelular de dicho receptor, e inducir algunas de las señales inmunitarias controladas por este receptor y proteínas asociadas. La especificidad de unión puede ser para el receptor TLR humano o para un receptor TLR homólogo al humano de una especie diferente.

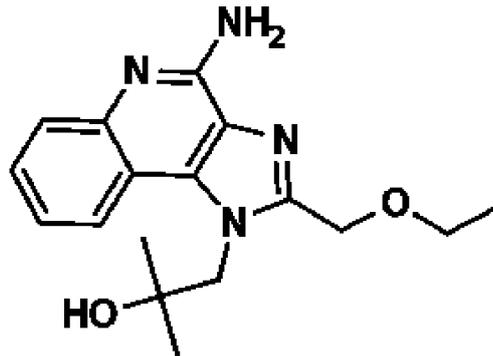
60 La expresión "receptores tipo Toll" o "TLR" se refiere a una familia de proteínas transmembrana de tipo I que forman parte del sistema inmunitario innato. En vertebrados también permiten la adaptación del sistema inmunitario. Los TLR, junto con los receptores de interleucina, forman una superfamilia conocida como la superfamilia de Interleucina-1/receptores tipo Toll. Todos los miembros de esta familia tienen en común el dominio denominado dominio del receptor Toll-IL-1 (TIL).

65 Cualquier agonista de un TLR se puede utilizar en el primer método de la invención junto con IL-2 para estimular los linfocitos B de memoria. Los ejemplos de agonistas de TLR que se pueden utilizar en la etapa (i) del primer método de la invención incluyen:

- agonistas de TLR-1. Los ejemplos no limitantes de agonistas de TLR-1 incluyen lipopéptidos (LPs) tri-acilados; modulinas solubles en fenol; LP de *Mycobacterium tuberculosis*; S-(2,3-bis(palmitoiloxi)-(2-RS)-propil)-N-palmitoil-1-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH, LP de trihidrocloruro (Pam3Cys) que simula el extremo amino acetilado de una lipoproteína bacteriana y LP de OspA de *Borrelia burgdorferi*.
- 5 - agonistas de TLR-2. Los ejemplos no limitantes de agonistas de TLR-2 incluyen, sin limitación, uno o más de un lipopéptido bacteriano de *M. tuberculosis*, *B. burgdorferi*, *T. pallidum*; peptidoglucanos de especies que incluyen *Staphylococcus aureus*; ácidos lipoteicoicos, ácidos manurónicos, porinas de *Neisseria*, fimbrias bacterianas, factores de virulencia de *Yersinia*, viriones de CMV, hemaglutinina de sarampión y zimosina de levadura.
- agonistas de TLR-3, tales como ARN bicatenario, o ácido poliinosínico-policitidílico (Poli I:C).
- 10 - agonistas de TLR-4, tales como el lipopolisacárido (LPS) de bacterias gramnegativas, o fragmentos de las mismas; proteína de choque térmico (HSP, de sus siglas en inglés) 10, 60, 65, 70, 75 o 90; Proteína A tensioactiva, oligosacáridos de ácido hialurónico, fragmentos de sulfato de heparano, fragmentos de fibronectina, péptidos de fibrinógeno y b-defensina-2.
- 15 - agonistas de tipo TLR-5, flagelina o una variante funcionalmente equivalente de la misma. Las flagelinas adecuadas para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen la flagelina codificada por el gen fljB de *Salmonella* entérica serovar Typhymurium LT2 así como cualquier cepa de flagelina de *Salmonella entérica* que sea conocida y esté disponible públicamente en GenBank.
- agonistas de TLR-6 tales como lipoproteínas micobacterianas, LP diaciladas y modulina soluble en fenol. Otros agonistas de TLR6 se describen en el documento WO2003043572.
- 20 - agonistas de TLR7 como Resiquimod (R848), loxoribina, un análogo de guanosina en las posiciones N7 y C8, o un compuesto de imidazoquinolina, o un derivado de los mismos. En una realización, el agonista de TLR es Imiquimod. Otros agonistas de TLR7 se describen en el documento WO02085905.
- agonistas de TLR-8 como Resiquimod (R848) o los descritos en el documento WO2004071459.
- agonistas de TLR-9 como un ADN que contiene nucleótidos CpG no metilados, en particular contextos de secuencia conocidos como motivos CpG. Los oligonucleótidos que contienen CpG inducen una respuesta predominantemente Th1. Tales oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y las patentes de EE.UU. n.º 6.008.200 y 5.856.462.
- 25 - agonistas de TLR-10.
- agonistas de TLR que puede causar una respuesta de señalización a través de cualquier combinación de dos o más de los TLR anteriores, por ejemplo, un agonista de TLR-7 y TLR-8 (agonista de TLR7/8) como Resiquimod (R848).
- 30

En una realización preferida, el agonista de TLR es un agonista TLR-7/8. En una realización más preferida, el agonistas de TLR-7/8 es R848.

35 El término "Resiquimod" o "R848", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto de imidazoquinolina con la fórmula:



40 R848 es un agonista de TLR-7 y TLR-8.

El término "CD40" se refiere a una proteína coestimuladora que se encuentra en células presentadoras de antígenos (APC), como los linfocitos B, que se requieren para su activación. La unión de CD154 (CD40L) en linfocitos T_H a CD40 activa las APC e induce una variedad de efectos posteriores. De manera similar, la activación de APC se puede lograr con la unión de un anticuerpo anti-CD40, preferentemente un anticuerpo anti-CD40 agonista. Los métodos para evaluar si un anticuerpo anti-CD40 es agonista son bien conocidos por el experto en la materia, e incluyen métodos para estimular la proliferación de linfocitos B en presencia de IL-4 o IL-2 de una manera dependiente de la dosis, tal como medidos mediante, por ejemplo, reactivos adecuados para medir la viabilidad celular y/o la actividad metabólica, tal como la resazurina.

45

50

(ii) *Capturar los anticuerpos secretados por los linfocitos B de memoria estimulados de la etapa (i) con un anticuerpo específico para IgG o IgM*

5 La etapa de capturar los anticuerpos secretados por los linfocitos B estimulados se realiza mediante la incubación de los linfocitos B estimulados de la etapa (i) con un anticuerpo específico para IgG o IgM, es decir, un anticuerpo de captura.

10 El término "anticuerpo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno, que se une específicamente (inmunorreacción) con un antígeno, tal como, por ejemplo, una proteína. Los anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen cualquier agente capaz de unirse a un ligando con alta afinidad, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, así como fragmentos de anticuerpos o construcciones de anticuerpos que tienen un sitio de unión a antígeno, tal como Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpos de dominio único o DABS, Fv, scFv y similares, también conocidos como "fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo". El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. El anticuerpo puede ser también de cualquier origen, incluyendo, sin limitación, anticuerpos murinos, anticuerpos humanos, anticuerpos de tiburón y anticuerpos de camélidos. Cuando el anticuerpo no es de origen humano, puede ser quimérico o humanizado. Las técnicas para preparar dichos anticuerpos son bien conocidas para un experto en la técnica.

20 La expresión "anticuerpo específico para IgG o IgM" o "anticuerpo de captura", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a la región constante de la cadena pesada, que es idéntica en todos los anticuerpos del mismo isotipo, de un anticuerpo IgG o de un anticuerpo IgM.

25 El término "inmunoglobulina G" o "IgG", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un isotipo de anticuerpo de aproximadamente 150 kDa compuesto por cuatro cadenas peptídicas. Contiene dos cadenas pesadas de clase y idénticas de aproximadamente 50 kDa y dos cadenas ligeras idénticas de aproximadamente 25 kDa, por lo tanto, una estructura cuaternaria tetramérica. Las dos cadenas pesadas están unidas entre sí y a una cadena ligera cada una por enlaces disulfuro. El tetrámero resultante tiene dos mitades idénticas, que juntas forman una Y. Cada extremo de la horquilla contiene un sitio de unión a antígeno idéntico. Las regiones Fc de IgG tienen un sitio de N-glucosilación altamente conservado. Los N-polisacáridos unidos a este sitio son predominantemente estructuras diantenarias núcleo-fucosiladas de tipo complejo. Además, pequeñas cantidades de estos N-polisacáridos también contienen restos de GlcNAc y ácido siálico con enlaces α -2,6 entrecruzados.

35 El término "inmunoglobulina M" o "IgM", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un isotipo de anticuerpo de aproximadamente 970 kDa compuesto de múltiples inmunoglobulinas unidas covalentemente mediante enlaces disulfuro que forman un pentámero o un hexámero, aunque también puede existir como un monómero. Cada monómero consta de cuatro cadenas peptídicas, dos cadenas pesadas μ idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. En la forma pentamérica, la IgM tiene una cadena J unida covalentemente a través de enlaces disulfuro que funciona en la polimerización de la molécula en un pentámero.

40 En una realización particular, el anticuerpo de captura se inmoviliza sobre una superficie sólida, por ejemplo, una placa de micropocillos o de múltiples pocillos. La superficie sólida está hecha preferentemente de difluoruro de polivinilideno (PVDF). En esta realización particular, es posible agregar los linfocitos B estimulados de la etapa (i), más específicamente, la muestra que contiene linfocitos B estimulados resultantes de la etapa (i) sobre una superficie, por ejemplo, una placa, más específicamente, una placa de PVDF, precubierta con el anticuerpo específico para IgG o IgM.

50 Como sabe el experto, para capturar los anticuerpos secretados por el linfocito B estimulado, es decir, para permitir la unión de los anticuerpos secretados por el linfocito B estimulado al anticuerpo específico para IgG o IgM, el contacto entre ambos tipos de anticuerpos debe realizarse en las condiciones apropiadas para dicha unión. La persona experta será capaz de determinar qué condiciones (temperatura, tiempo de incubación, etc.) son las más adecuadas para capturar los anticuerpos secretados. En una realización particular, la captura se realiza mediante la incubación de la muestra que contiene los linfocitos B estimulados en una placa precubierta con el anticuerpo específico para IgG o IgM en una incubadora a 37 °C durante 24 horas.

55 En otra realización, una vez que los anticuerpos secretados por los linfocitos B estimulados se han puesto en contacto con el anticuerpo específico para IgG o IgM, la mezcla se puede lavar una o más veces para eliminar los anticuerpos no unidos específicamente que podrían influir en la lectura.

60 (iii) *Poner en contacto los anticuerpos capturados en la etapa (ii) con al menos un multímero HLA de dicho HLA*

La etapa de poner en contacto los anticuerpos capturados en la etapa (ii) con al menos un multímero HLA de dicho HLA para el cual deben detectarse linfocitos B secretores de anticuerpos específicos se realiza mediante la incubación de dichos anticuerpos capturados con al menos un multímero HLA de dicho HLA.

65

La expresión "multímero HLA", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una forma oligomérica de una molécula de HLA. Los multímeros HLA comprenden una cadena principal a la que están unidos los monómeros HLA, creando una estructura multimérica. Ejemplos ilustrativos no limitativos de multímeros HLA incluyen multímeros HLA que comprenden al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o al menos 7, o al menos 8, o al menos 9, o al menos 10, o al menos 11, o al menos 12 moléculas de HLA, preferentemente entre 4 y 12 moléculas de HLA, más preferentemente entre 5 y 10 moléculas de HLA, incluso más preferentemente entre 6 y 9 moléculas de HLA. Se entenderá que las moléculas de HLA no tienen que ser iguales o del mismo tipo en el multímero HLA. En una realización particular, el multímero HLA es un dextramer HLA, que comprende moléculas de HLA unidas a una cadena principal de dextrano.

En una realización particular, el multímero HLA es una molécula polimérica a la que se une una pluralidad de moléculas de dicho HLA.

La expresión "molécula polimérica", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto químico o mezcla de compuestos que consiste en la repetición de unidades estructurales creadas solo a través de un proceso de polimerización. La molécula polimérica puede contener solo un solo tipo de unidad de repetición (homopolímeros), o una mezcla de unidades de repetición (heteropolímeros o copolímeros). Cualquier molécula polimérica a la que se puedan unir múltiples moléculas de HLA puede formar parte del multímero HLA de acuerdo con el método del primer aspecto. En una realización particular, la molécula polimérica es dextrano.

El término "dextrano", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un glucano ramificado complejo compuesto de cadenas de longitudes variables (desde 3 hasta 2000 Kda). La cadena recta consiste en moléculas de glucosa unidas mediante enlaces glucosídicos α -1,6, mientras que las ramas comienzan a partir de enlaces α -1,3.

En otra realización particular, se une un marcador al multímero HLA.

Opcionalmente, los multímeros HLA que contienen más de un tipo de molécula de HLA pueden ponerse en contacto con los anticuerpos capturados para permitir la detección simultánea de linfocitos B secretores de anticuerpos con diferentes especificidades de HLA.

Por lo tanto, en otra realización particular, los anticuerpos capturados en la etapa (ii) se ponen en contacto con al menos dos multímeros HLA, en donde el tipo de moléculas de HLA contenidas en cada uno de dichos al menos dos multímeros HLA es diferente. En una realización preferida, los anticuerpos capturados en la etapa (ii) se ponen en contacto con al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o al menos 7, o al menos 8, o al menos 9, o al menos 10 multímeros HLA, en donde el tipo de moléculas de HLA contenidas en cada uno de dichos al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o al menos 7, o al menos 8, o al menos 9, o al menos 10 multímeros HLA, respectivamente, es diferente. Cuando se utilizan multímeros HLA de diferente especificidad HLA, pueden contener el mismo o diferente número de moléculas de HLA. Se entenderá inmediatamente que para ciertos fines, tales como para cuantificar los niveles de anticuerpos que se unen a HLA de diferentes especificidades, se prefiere que los multímeros HLA de diferente especificidad HLA contengan el mismo número de moléculas de HLA.

En una realización preferida, se une un marcador diferente a cada uno de los al menos dos multímeros HLA.

El término "marcador", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier composición que se puede utilizar para detectar, cualitativamente o cuantitativamente, una sustancia unida al marcador. Los marcadores adecuados incluyen una fracción fluorescente, un radioisótopo, un cromóforo, una fracción bioluminiscente, una enzima, una partícula magnética, una partícula densa de electrones, y similares. En una realización particular, el marcador es una molécula de fluorocromo.

La expresión "molécula de fluorocromo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a todos aquellos compuestos que absorben luz en un intervalo de longitud de onda o de longitud de onda determinado y emiten luz en un intervalo de longitud de onda o de longitud de onda diferente. Las moléculas fluorescentes adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, bromuro de etidio, SYBR Green, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina, R-ficoeritrina, tetrametil rodamina isotiol (TRIT), 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína, fluoresceína, HEX (6-carboxi-2',4',4',5',7',7'-hexaclorofluoresceína), Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Joe (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína), 5-carboxi-2',4',5',7'-tetraclorofluoresceína, 5-carboxirodamina, rodamina, tetrametilrodamina (Tamra), Rox (carboxi-X-rodamina), R6G (rodamina 6G), ftalocianinas, azometinas, cianinas (Cy2, Cy3 y Cy5), Texas Red, Princeton Red, BOD-IPY FL-Br2, BODIPY 530/550, BODIPY TMR, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY TR, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, DABCYL, Eosina, Eritrosina, bromuro de etidio, proteína fluorescente verde (GFP) o los análogos de la misma, marcadores fluorescentes inorgánicas basados en nanocristales semiconductores (Quantum dot), marcadores fluorescentes basados en lantánidos como Eu³⁺ y Sm³⁺ y similares.

En una realización preferida, la molécula de fluorocromo se selecciona entre FITC, ficoeritrina y R-ficoeritrina.

(iv) Detectar el multímero HLA de dicho HLA unido a los anticuerpos capturados en la etapa (ii)

La etapa de detectar el multímero HLA unido a la captura de anticuerpos en la etapa (ii) se puede realizar mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica apropiado para detectar multímeros HLA. El proceso de detección se puede incorporar en formatos de ensayo particulares que incluyen ilustrativamente ELISA, transferencia de Western, inmunoprecipitación, inmunocitoquímica, ensayo de inmunofluorescencia, cromatografía líquida, citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia, otras técnicas de detección conocidas en la técnica, o combinaciones de las mismas. Esta etapa puede requerir el uso de moléculas de detección secundarias específicas para el multímero HLA, como los anticuerpos conjugados con un marcador detectable. Esto es estándar en la técnica y el experto reconocerá inmediatamente qué moléculas de detección secundarias son adecuadas para el propósito de la invención.

En la realización particular donde un marcador está unido al multímero HLA, la detección se puede realizar mediante la detección de dicho marcador. El proceso de detección dependerá de la naturaleza del marcador. En una realización particular, si el marcador es una molécula de fluorocromo, se puede detectar mediante cualquier método que permita la determinación de fluorescencia, por ejemplo, un lector de fluorescencia.

Los niveles de anticuerpos específicos para HLA pueden normalizarse al nivel de anticuerpos totales presentes en la muestra. Esto permite una expresión más precisa de la cantidad y frecuencia específicas de cualquier clon de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA sobre el compartimiento de linfocitos B de memoria policlonales global, que permanece estable a lo largo del tiempo, lo que ilustra una mayor estabilidad de los linfocitos B de memoria anti-HLA en comparación con solo medir los anticuerpos anti-HLA circulantes. De esta manera, el método de detección de acuerdo con la invención permite la determinación de la relación de células que secretan anticuerpos específicos para HLA al número de células secretoras de anticuerpos totales. La normalización se puede llevar a cabo mediante la colocación en placas de un duplicado de la población celular estimulada, la captura de los anticuerpos de acuerdo con la etapa (ii) del método de la invención y la detección de anticuerpos utilizando un segundo anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a cualquier anticuerpo que se secreta por las células capturadas en la etapa (i).

Método para determinar el riesgo de que un sujeto tenga rechazo humoral después de un trasplante alogénico de órganos o tejidos

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el riesgo de que un sujeto tenga rechazo humoral después de un trasplante alogénico de órganos o tejidos, en lo sucesivo en el presente documento segundo método de la invención, que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA utilizando el método del primer aspecto, en el que dicho HLA está presente en el órgano o tejido trasplantado o en el órgano o tejido que se va a trasplantar y en el que niveles aumentados de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para dicho HLA en relación con un valor de referencia son indicativos de que dicho sujeto tiene un alto riesgo de rechazo humoral.

Los términos "*in vitro*", "sujeto", "linfocitos B secretores de anticuerpos" y "muestra" se han definido en relación con el primer método de la invención. Las realizaciones preferidas y particulares del primer método de la invención con respecto a estos términos también se incluyen en el segundo método de la invención.

El término "rechazo" o "rechazo de trasplante" se utiliza en la presente invención en un contexto de trasplante de tejido u órgano, y se relaciona con el proceso mediante el cual el sistema inmunitario del receptor rechaza un tejido u órgano trasplantado, que destruye el tejido u órgano trasplantado.

El término "rechazo humoral" o "rechazo mediado por anticuerpos" o "AMR", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un mecanismo o rechazo de trasplante, que está mediado por anticuerpos. El rechazo humoral incluye el rechazo hiperagudo (HAR, de sus siglas en inglés) y es un tipo de rechazo caracterizado por lesión aguda de aloinjerto que es resistente a la terapia potente anti-linfocitos T, mediante la detección de anticuerpos circulantes específicos de donante y la deposición de componentes del complemento en el injerto. El AMR con aloanticuerpos circulantes elevados y activación del complemento que se produce en el 20-30 por ciento de los casos de rechazo agudo tiene un pronóstico más precario que el rechazo celular.

El rechazo humoral puede ser agudo o crónico.

El rechazo agudo, que comienza 2-60 días después del trasplante, se caracteriza por la inflamación intersticial de las células endoteliales vasculares, la acumulación intersticial de linfocitos, plasmocitos, inmunoblastos, macrófagos, neutrófilos; separación tubular con edema/necrosis del epitelio tubular; inflamación y vacuolización de las células endoteliales, edema vascular, sangrado e inflamación, necrosis tubular renal, glomérulos esclerosados, 'tiroidización' tubular, eliminación de creatinina, malestar, fiebre, HTA, oliguria. El rechazo agudo se produce hasta cierto punto en todos los trasplantes, excepto entre gemelos idénticos, a menos que se logre la inmunosupresión (generalmente a través de fármacos). El rechazo agudo comienza tan pronto como una semana después del trasplante, el riesgo más alto en los primeros tres meses, aunque puede ocurrir meses o años después. Los tejidos altamente vasculares, como el riñón o el hígado, a menudo presentan los signos más tempranos, particularmente en las células endoteliales que

recubren los vasos sanguíneos, aunque eventualmente ocurre en aproximadamente el 10 al 30 % de los trasplantes de riñón y del 50 al 60 % de los trasplantes de hígado. En general, el rechazo agudo se puede inhibir o suprimir con fármacos inmunosupresores como la rapamicina, la ciclosporina A, el anticuerpo monoclonal anti-CD40L y similares. En el contexto de la invención, se considera que el rechazo agudo ocurre al menos 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 1 mes, 2 meses, 3 meses o 6 meses después del trasplante.

El rechazo crónico tiene un inicio tardío, a menudo más de 60 días después del trasplante, y con frecuencia acompañado de cambios agudos superpuestos, aumento de las células mesangiales con proliferación y formación creciente miointimal; glomerulonefritis mesangioproliferativa y fibrosis intersticial; en general, hay una mala respuesta a los corticosteroides. Ocurre en seres humanos dentro de varios meses o años después del injerto, incluso en presencia de una inmunosupresión exitosa del rechazo agudo. La fibrosis es un factor común en el rechazo crónico de todos los tipos de trasplantes de órganos. El rechazo crónico puede ser descrito normalmente por una variedad de trastornos específicos que son característicos del órgano en particular. Por ejemplo, en trasplantes de pulmón, dichos trastornos incluyen la destrucción fibroproliferativa de la vía aérea (bronquiolitis obliterante); en trasplantes de corazón o trasplantes de tejido cardíaco, tales como reemplazos de válvulas, dichos trastornos incluyen aterosclerosis fibrótica; en trasplantes de riñón, dichos trastornos incluyen nefropatía obstructiva, nefrosclerosis, nefropatía tubulointersticial; y en trasplantes de hígado, dichos trastornos incluyen la desaparición del síndrome del conducto biliar. El rechazo crónico también se puede caracterizar por lesiones isquémicas, denervación del tejido trasplantado, hiperlipidemia e hipertensión asociada con fármacos inmunosupresores. En el contexto de la invención, se considera que el rechazo crónico se produce meses después del trasplante. En una realización preferida de la invención, se considera que el rechazo crónico ocurre al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses o al menos 6 meses después del trasplante.

La expresión "trasplante de órganos o tejidos", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un procedimiento quirúrgico mediante el cual un tejido u órgano se transfiere de un sujeto donante a un sujeto receptor o de una parte del cuerpo a otra en el mismo sujeto. Los tejidos trasplantados comprenden, pero sin limitación, tejido óseo, tendones, tejido corneal, válvulas cardíacas, venas y médula ósea. Los órganos trasplantados comprenden, pero sin limitación, el corazón, pulmón, hígado, riñón, páncreas e intestino. En una realización particular, el trasplante es un trasplante de órgano. En una realización más particular, el trasplante de órgano es un trasplante de riñón.

La expresión "trasplante alogénico de órganos o tejidos" o "alotrasplante", como se utiliza en el presente documento, se refiere al trasplante de tejidos u órganos procedentes de un miembro genéticamente no idéntico de la misma especie que el receptor. El término "alotrasplantable" se refiere a los órganos o tejidos que se trasplantan de manera relativamente frecuente o rutinaria. Los ejemplos de órganos alotrasplantables incluyen corazón, pulmón, hígado, páncreas, riñón e intestino.

La expresión "método para determinar el riesgo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un método para determinar la probabilidad de un acontecimiento en particular. En el contexto del segundo método de la invención, determinar el riesgo de que un sujeto tenga rechazo humoral después de un trasplante alogénico de órganos o tejidos se refiere a determinar si dicho sujeto tiene una alta probabilidad de tener rechazo humoral. El término "alto riesgo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una probabilidad significativamente alta de tener un rechazo humoral. En una realización particular, un riesgo alto es una probabilidad de al menos aproximadamente el 20 %, que incluye pero no se limita a aproximadamente el 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 1000 % y 1500 %. En una realización particular, un riesgo alto es una probabilidad de al menos el 100 %. En otras realizaciones, un riesgo alto es una probabilidad de al menos el 200 %, al menos el 300 %, al menos el 400 %, al menos el 500 %, al menos el 700 %, al menos el 800 %, al menos el 900 % y al menos el 1000 %. Sin embargo, también se contemplan otros cortes o intervalos que los expertos en la técnica consideran adecuados para caracterizar la invención, y que también están dentro del alcance de la presente invención.

El segundo método de la invención comprende determinar en una muestra del sujeto los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA que está presente en el órgano o tejido trasplantado o en el órgano o tejido a trasplantar utilizando el primer método de la invención.

El método del segundo aspecto se puede realizar antes o después del trasplante alogénico del tejido u órgano. En una realización particular, el riesgo de tener un rechazo humoral se determina antes del trasplante alogénico del tejido u órgano, es decir, los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA que está presente en el tejido u órgano a trasplantar son determinados antes del trasplante alogénico de dicho tejido u órgano. En otra realización particular, el riesgo de tener un rechazo humoral se determina después del trasplante alogénico del tejido u órgano, es decir, los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA que está presente en el tejido u órgano trasplantado son determinados después del trasplante alogénico de dicho tejido u órgano.

La expresión "altos niveles" aplicado a los niveles de los linfocitos B secretores de anticuerpos para al menos un HLA se refiere a cualquier nivel de dichos linfocitos B secretores de anticuerpos que sea más alto que un valor de referencia.

Los niveles de dichos linfocitos B secretores de anticuerpos se consideran más altos que su valor de referencia cuando son al menos el 1,5 %, al menos el 2 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos el 110 %, al menos el 120 %, al menos el 130 %, al menos el 140 %, al menos el 150 %, o superior a su valor de referencia.

La expresión "valor de referencia", como se utiliza en el presente documento, se relaciona con un criterio predeterminado utilizado como referencia para evaluar los valores o datos obtenidos de las muestras recolectadas de un sujeto. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite superior o inferior, un intervalo de valores, un valor promedio, un valor de mediana, un valor medio, o un valor que se compara con un valor de control o inicial concreto. Un valor de referencia puede estar basado en un valor de la muestra individual, tal como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que se está analizando, pero en un punto anterior en el tiempo. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, tal como en una población de sujetos del grupo de la misma edad cronológica, o basarse en un conjunto de muestras que incluyen o excluyen la muestra analizar.

El valor de referencia de acuerdo con el segundo método de la invención se puede obtener de uno o más sujetos no trasplantados o de uno o más sujetos trasplantados que se sabe que no sufren rechazo (es decir, sujetos control).

En una realización particular, el segundo método de la invención comprende además la determinación de la relación de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA al número de células secretoras de anticuerpos totales. En esta realización particular, un aumento en dicha relación en relación con un valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto tiene un alto riesgo de rechazo humoral. La determinación de la relación de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA con respecto al número de células que secretan anticuerpos se ha explicado previamente en relación con el primer método de la invención. En el contexto del segundo método de la invención, la relación se considera "aumentada" cuando dicha relación es más alta que el valor de referencia. El término "más alto" que su referencia significa que el valor de la relación es de al menos el 1,5 %, al menos el 2 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos el 110 %, al menos el 120 %, al menos el 130 %, al menos el 140 %, al menos el 150 %, o superior a su valor de referencia. El valor de referencia de acuerdo con esta realización particular puede ser la relación entre los linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA y el número de células totales que secretan anticuerpos obtenidos de uno o más sujetos no trasplantados o de uno o más sujetos trasplantados que se sabe que no sufren rechazo (es decir, sujetos control).

Método para determinar el riesgo de que un sujeto sufra endarteritis asociado con un rechazo humoral postrasplante después de un trasplante alogénico de órganos o tejidos

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el riesgo de que un sujeto sufra endarteritis asociado con un rechazo humoral postrasplante después de un trasplante alogénico de órganos o tejidos, que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA utilizando el método del primer aspecto, en el que dicho HLA está presente en el órgano o tejido trasplantado o en el órgano o tejido que se va a trasplantar y en el que niveles aumentados de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para dicho HLA en relación con un valor de referencia son indicativos de que dicho sujeto tiene un alto riesgo de sufrir endarteritis asociada con el rechazo humoral posterior al trasplante.

La expresión "método para determinar el riesgo", "*in vitro*", "sujeto", "trasplante alogénico de órganos o tejidos", "muestra", "linfocitos B secretores de anticuerpos" y "HLA" se han definido en relación con el primer y el segundo método de la invención. Las realizaciones preferidas y particulares del primer y segundo método de la invención con respecto a estos términos también se incluyen en el tercer método de la invención.

El término "endarteritis" o "endarteritis obliterante" o "arteritis obliterante" se relaciona con una endarteritis proliferativa grave, que es una inflamación de la íntima o revestimiento interno de una arteria que da como resultado una oclusión del lumen de la arteria. La endarteritis puede ocurrir debido a una variedad de afecciones médicas, tales como una complicación de envenenamiento por radiación, tuberculosis, meningitis o infección por sífilis o rechazo humoral postrasplante.

En una realización, la endarteritis se produce en el órgano o tejido trasplantado.

El tercer método de la invención comprende determinar en una muestra del sujeto los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA que está presente en el órgano o tejido trasplantado o en el órgano o tejido a trasplantar utilizando el primer método de la invención.

El método del tercer aspecto se puede realizar antes o después del trasplante alogénico del tejido u órgano. En una realización particular, el riesgo de sufrir endarteritis asociada con el rechazo humoral postrasplante después del trasplante alogénico de órganos o tejidos se determina antes del trasplante alogénico del tejido u órgano, es decir, los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA que está presente en el tejido u órgano a trasplantar son determinados antes del trasplante alogénico de dicho tejido u órgano. En otra realización particular, el riesgo de sufrir endarteritis asociada con el rechazo humoral postrasplante después del trasplante alogénico de órganos o tejidos se determina después del trasplante alogénico del tejido u órgano, es decir, los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA que está presente en el tejido u órgano trasplantado son determinados después del trasplante alogénico de dicho tejido u órgano.

La expresión "altos niveles" aplicado a los niveles de los linfocitos B secretores de anticuerpos para al menos un HLA se refiere a cualquier nivel de dichos linfocitos B secretores de anticuerpos que sea más alto que un valor de referencia. Los niveles de dichos linfocitos B secretores de anticuerpos se consideran más altos que su valor de referencia cuando son al menos el 1,5 %, al menos el 2 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos el 110 %, al menos el 120 %, al menos el 130 %, al menos el 140 %, al menos el 150 %, o superior a su valor de referencia.

La expresión "valor de referencia", como se utiliza en el presente documento, se relaciona con un criterio predeterminado utilizado como referencia para evaluar los valores o datos obtenidos de las muestras recolectadas de un sujeto. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite superior o inferior, un intervalo de valores, un valor promedio, un valor de mediana, un valor medio, o un valor que se compara con un valor de control o inicial concreto. Un valor de referencia puede estar basado en un valor de la muestra individual, tal como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que se está analizando, pero en un punto anterior en el tiempo. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, tal como en una población de sujetos del grupo de la misma edad cronológica, o basarse en un conjunto de muestras que incluyen o excluyen la muestra analizar.

El valor de referencia de acuerdo con el tercer método de la invención se puede obtener de uno o más sujetos trasplantados que sufren un rechazo humoral posterior al trasplante después de un trasplante alogénico de órganos o tejidos y se sabe que no presentan endarteritis, o de uno o más sujetos trasplantados que se sabe que no sufren rechazo (es decir, sujetos control).

En una realización particular, el tercer método de la invención comprende además la determinación de la relación de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA al número de células secretoras de anticuerpos totales. En esta realización particular, un aumento en dicha relación en relación con un valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto tiene un alto riesgo de rechazo humoral. La determinación de la relación de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA con respecto al número de células que secretan anticuerpos se ha explicado previamente en relación con el primer método de la invención. En el contexto del segundo método de la invención, la relación se considera "aumentada" cuando dicha relación es más alta que el valor de referencia. El término "más alto" que su referencia significa que el valor de la relación es de al menos el 1,5 %, al menos el 2 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos el 110 %, al menos el 120 %, al menos el 130 %, al menos el 140 %, al menos el 150 %, o superior a su valor de referencia. El valor de referencia de acuerdo con esta realización particular puede ser la relación entre los linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA y el número de células totales que secretan anticuerpos obtenidos de uno o más sujetos trasplantados que se sabe que no sufren endarteritis asociada con el rechazo humoral postrasplante después del trasplante alogénico de órganos o tejidos (es decir, sujetos control).

Método para seleccionar un sujeto para recibir un trasplante alogénico de órganos o tejidos

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para seleccionar a un sujeto para recibir un trasplante alogénico de órganos o tejidos, en lo sucesivo en el presente documento tercer método de la invención, que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA utilizando el método del primer aspecto, en el que dicho HLA está presente en el órgano o tejido que se va a trasplantar y en el que el sujeto se selecciona para recibir dicho trasplante alogénico de órganos o tejidos si se detectan niveles bajos de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para dicho HLA en relación con un valor de referencia.

Los términos "*in vitro*", "sujeto", "trasplante alogénico de órganos o tejidos", "muestra", "linfocitos B secretores de anticuerpos", "HLA" y "valor de referencia" se han definido en relación con el primer y el segundo método de la invención. Las realizaciones preferidas y particulares del primer y segundo método de la invención con respecto a estos términos también se incluyen en el cuarto método de la invención.

La expresión "método para seleccionar", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la acción de elegir dicho sujeto para recibir un órgano o tejido alogénico.

5 De acuerdo con el cuarto método de la invención, se selecciona un sujeto para recibir un trasplante alogénico de órganos o tejidos si se detectan bajos niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA que está presente en el órgano o tejido a trasplantar en una muestra de dicho sujeto en relación a un valor de referencia.

10 La expresión "niveles disminuidos" aplicado a los niveles de los linfocitos B secretores de anticuerpos para al menos un HLA se refiere a cualquier nivel de dichos linfocitos B secretores de anticuerpos que sea más bajo que un valor de referencia. Los niveles de dichos linfocitos B secretores de anticuerpos se consideran más bajos que su valor de referencia cuando son al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos el 110 %, al menos el 120 %, al menos el 130 %, al menos el 140 %, al menos el 150 %, o inferior a su valor de referencia.

En una realización particular, el trasplante de órgano es un trasplante de riñón.

20 En una realización particular, el cuarto método de la invención comprende además la determinación de la relación de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA al número de células secretoras de anticuerpos totales. En esta realización particular, se selecciona un sujeto para recibir el trasplante alogénico de órganos o tejidos si se detecta una disminución en dicha relación en relación con un valor de referencia en una muestra de dicho sujeto. La determinación de la relación de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA con respecto al número de células que secretan anticuerpos se ha explicado previamente en relación con el primer método de la invención.

25 En el contexto del cuarto método de la invención, la relación se considera "disminuida" cuando dicha relación es más baja que el valor de referencia. La relación se considera más baja que su valor de referencia cuando son al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos el 110 %, al menos el 120 %, al menos el 130 %, al menos el 140 %, al menos el 150 %, o inferior a su valor de referencia.

35 El valor de referencia de acuerdo con esta realización particular puede ser la relación entre los linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA y el número de células totales que secretan anticuerpos obtenidos de uno o más sujetos no trasplantados o de uno o más sujetos trasplantados que se sabe que no sufren rechazo (es decir, sujetos control).

40 En una realización particular, el cuarto método de la invención comprende además la determinación de la relación de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA al número de células secretoras de anticuerpos totales. En esta realización particular, un aumento en dicha relación en relación con un valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto tiene un alto riesgo de rechazo humoral. La determinación de la relación de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA con respecto al número de células que secretan anticuerpos se ha explicado previamente en relación con el primer método de la invención. En el contexto del segundo método de la invención, la relación se considera "aumentada" cuando dicha relación es más alta que el valor de referencia. El término "más alto" que su referencia significa que el valor de la relación es de al menos el 1,5 %, al menos el 2 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos el 110 %, al menos el 120 %, al menos el 130 %, al menos el 140 %, al menos el 150 %, o superior a su valor de referencia. El valor de referencia de acuerdo con esta realización particular puede ser la relación entre los linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA y el número de células totales que secretan anticuerpos obtenidos de uno o más sujetos no trasplantados (es decir, sujetos control).

55 Método para determinar la presencia de sensibilización humoral contra un HLA

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar la presencia de sensibilización humoral contra al menos un HLA en un sujeto, en lo sucesivo en el presente documento cuarto método de la invención, que comprende detectar los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para dicho HLA utilizando el método del primer aspecto, en el que la detección de un linfocito B secretor de anticuerpos específico para dicho HLA es indicativa de que dicho sujeto tiene una sensibilización humoral contra dicho HLA.

65 Los términos "*in vitro*", "HLA", "sujeto" y "linfocitos B secretores de anticuerpos" se han definido en relación con el primer y segundo método de la invención. Las realizaciones preferidas y particulares del primer método de la invención con respecto a estos términos también se incluyen en el quinto método de la invención.

La expresión "sensibilización humoral", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la presencia detectable en un sujeto antes de recibir un trasplante de anticuerpos circulantes específicos para un HLA que está presente en el tejido u órgano candidato para ser trasplantado. De acuerdo con el cuarto método de la invención, cualquier nivel detectable de dichos linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para un HLA presente en el tejido u órgano a trasplantar es indicativo de sensibilización humoral contra dicho HLA.

En una realización particular, cuando se detecta un linfocito B secretor de anticuerpos específicos para dicho HLA, el método comprende además una etapa de correlacionar los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para dicho HLA con un grado de sensibilización humoral.

El experto en la materia puede determinar los grados de sensibilización humoral en función de los niveles de anticuerpos circulantes específicos para HLA, que están presentes en el tejido u órgano a trasplantar. La clasificación de los diferentes grados de sensibilización humoral variará dependiendo de las técnicas utilizadas para detectar dichos anticuerpos circulantes contra HLA del tejido u órgano a trasplantar (Lefaucheur et al., J. Am. Soc. Nephrol., 2010, 21(8): 1398-406; Claas and Doxiadis, Curr. Opin. Immunol. 2009, 21(5): 569-72; Gebel et al., Am. J. Transplant 2003; 3: 1488-1500).

El anticuerpo específico para un HLA puede ser una IgG o una IgM.

En una realización particular, el quinto método de la invención comprende además la determinación de la relación de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA al número de células secretoras de anticuerpos totales. En esta realización particular, la detección de un aumento en dicha relación en una muestra del sujeto en relación con un valor de referencia es indicativa de que dicho sujeto tiene una sensibilización humoral contra dicho HLA. La determinación de la relación de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA con respecto al número de células que secretan anticuerpos se ha explicado previamente en relación con el primer método de la invención. El término "aumentado" se ha definido previamente en relación con el segundo método de la invención. El valor de referencia de acuerdo con esta realización particular puede ser la relación entre los linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para HLA y el número de células totales que secretan anticuerpos obtenidos de uno o más sujetos no trasplantados o de uno o más sujetos trasplantados que se sabe que no sufren rechazo (es decir, sujetos control).

Kit para detectar linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para un HLA

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para detectar linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para un HLA en una muestra que comprende linfocitos B que comprenden un anticuerpo específico para IgG o IgM y un multímero HLA.

Como se utiliza en el presente documento, el término "kit" se utiliza en referencia a una combinación de artículos que facilitan los métodos de la presente invención. Estos kits proporcionan los materiales necesarios para llevar a cabo la aplicación descrita en el presente documento.

Los términos "linfocitos B secretores de anticuerpos", "HLA", "muestra que comprende linfocitos B" se han definido previamente en relación con el primer y segundo método de la invención. Las realizaciones preferidas y particulares del primer método de la invención con respecto a estos términos también se incluyen en el segundo método de la invención.

El kit de la invención comprende un anticuerpo específico para IgG o IgM. La expresión "anticuerpo específico para IgG o IgM" se ha definido previamente en relación con el primer método de la invención.

En una realización particular, el anticuerpo específico para IgG o IgM se inmoviliza sobre una superficie sólida, por ejemplo, sobre una placa de PVDF (difluoruro de polivinilideno). En una realización más particular, el anticuerpo específico para IgG o IgM se inmoviliza sobre una microplaca de 96 pocillos.

El kit de la invención comprende un multímero HLA. El término "multímero HLA" se ha definido previamente en relación con el primer método de la invención.

En una realización particular, el multímero HLA es una molécula polimérica a la que se une una pluralidad de moléculas de dicho HLA.

En una realización particular, la molécula polimérica es dextrano.

En una realización particular, se une un marcador al multímero HLA.

En otra realización particular, el kit de la invención comprende al menos dos multímeros HLA de HLA diferentes. En una realización preferida, se une un marcador diferente a cada uno de los al menos dos multímeros HLA.

En una realización particular, el marcador es una molécula de fluorocromo.

Las expresiones "molécula polimérica", "dextranso", "marcador" y "molécula de fluorocromo" se han definido previamente en relación con el primer método de la invención.

5 En una realización particular, el kit de la invención comprende además IL-2. El término "IL-2" se ha definido previamente en relación con el primer método de la invención.

10 En una realización particular, el kit de la invención comprende además un agonista de TLR. El término "agonista de TLR" se ha definido previamente en relación con el primer método de la invención.

15 En una realización preferida, el agonista de TLR es un agonista TLR-7/8. En una realización más particular, el agonista de TLR-7/8 es R848. Los términos "agonista de TLR-7/8" y "R848" se han definido previamente en relación con el primer método de la invención.

En otra realización particular, el kit de la invención comprende además un anticuerpo antiCD40, preferentemente un anticuerpo anti-CD40 agonista. El término "CD40" se ha definido previamente en relación con el primer método de la invención.

20 En una realización preferida, el kit de la invención comprende IL-2 y un agonista de TLR, preferentemente un agonista de TLR-7/8, más preferentemente R848.

En otra realización preferida, el kit de la invención comprende IL-2 y un anticuerpo antiCD40, preferentemente un anticuerpo anti-CD40 agonista.

25 En otra realización preferida, el kit de la invención comprende IL-2, un agonista de TLR, preferentemente un agonista de TLR-7/8, más preferentemente R848 y un anticuerpo anti-CD40, preferentemente un anticuerpo anti-CD40 agonista.

30 Ejemplos

EJEMPLO 1: Ensayo Elispot de linfocitos B-HLA

1. Propósito

35 El inmunoensayo ligado a enzimas (Elispot) es un método que se ha adaptado para la detección de células individuales que secretan anticuerpos contra antígenos HLA específicos, lo que permite la detección de la frecuencia de linfocitos B de memoria específicos para antígeno HLA circulantes. Los ensayos de Elispot emplean la técnica del ensayo inmunoabsorbente (ELISA) cuantitativo unido a enzimas intercaladas.

40 A diferencia de la evaluación de linfocitos T de memoria/efectores circulantes que son abundantes en la periferia, el número reducido de blastos de plasma que circulan en la sangre periférica hace que este enfoque no sea lo suficientemente factible y reproducible como para evaluar regularmente los linfocitos B secretores de anticuerpos (ASC) específicos para antígeno. No obstante, aunque los linfocitos B de memoria están presentes en la periferia, requieren una estimulación previa para diferenciarse en ASC detectables, por lo que se puede sembrar un número apropiado de células estimuladas en los pocillos de ELISPOT para determinar su inmunogenicidad específica para el antígeno HLA.

A. Definiciones y abreviaturas

50

RPMI 1640:	Medio Roswell Park Memorial 1640
PBMC:	células mononucleares de sangre periférica
Medio completo:	RPMI 1640 que contiene FBS al 10 %, P/S al 1 % y L-Glutamina 2 mM
FCS:	Suero bovino fetal, inactivado por calor durante 30 minutos a 57 °C
PBS:	Solución salina tamponada con fosfato
P/S:	Penicilina/Estreptomina
BSA:	albúmina de suero bovina
R848:	Imidazoquinolina
DMF:	dimetilformamida
AEC:	3--- Amino--- 9--- etilcarbozol
Solución de bloqueo:	500 ml PBS que contiene 5 g de BSA y filtrado estéril (0,2 µm)
Solución de SEB:	5 µl de SEB diluido en 1 ml de medio completo
PBS—Tween:	500 ml de PBS (sin esterilizar = solución FALK) que contiene 250 µl de Tween 20
PBS—Tween—	500 ml de PBS (sin esterilizar) que contiene 5 g de BSA y
BSA:	filtrado y
TMB:	Sustrato TMB

Tampón AEC:	tampón acetato 0,1 M, 352 ml de solución de acetato de sodio 0,3 M. Diluir hasta 1000 ml, ajustar a pH 5,0
Temperatura ambiente:	19 —25 °C
MLR:	Reacción mixta de linfocitos

3. Materiales y Equipo

Todos los materiales en contacto con las células antes y durante el cultivo/estimulación deben ser estériles.

4. Procedimiento

Todas las etapas antes y durante la estimulación se realizan bajo condiciones estériles en una caja de flujo laminar. Asegurarse de que en todas las etapas realizadas fuera (por ejemplo, la incubación) todos los tubos estén cerrados.

A. Estimulación de los linfocitos B de memoria

Se cultivan PBMC frescas o descongeladas ($1,5 \times 10^6$ células/ml, a 37 °C, en CO₂ al 5 %) con medio de cultivo (RPMI complementado con L-glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 10 %, 0,1 mg/ml de penicilina G y 0,1 mg/ml de estreptomycin) y 10 ng/ml de interleucina 2 recombinante humana (rhIL-2) (Mabtech) y 1 µg/ml de agonista de TLR 7/8 R848 (Mabtech) durante 6 días en matraces de cultivo a 37 °C, CO₂ al 5 %.

B. Evaluación de la frecuencia de linfocitos B secretores de IgG específicas de antígeno HLA (ensayo ELISPOT)

Un anticuerpo monoclonal específico para la IgG humana se recubre previamente sobre placas Multiscreen de Elispot de PVDF (difluoruro de polivinilideno) (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos).

Una vez que se estimulan los linfocitos B de memoria y se obtiene las ASC, se pueden sembrar en las placas de pocillos ELISPOT y colocarlas en una incubadora a 37 °C durante 24 horas. Durante este período de incubación/secreción, el anticuerpo inmovilizado en las inmediaciones de las células secretoras se une a la IgG específica del antígeno secretado.

Después de lavar cualquier célula y sustancia no unida, se agrega un anticuerpo policlonal biotinilado específico para la IgG humana y una molécula de HLA-dextramer marcada con colorante fluorescente (Immudex, Dinamarca). Después de un lavado, la visualización de manchas de color verde aparece en los sitios de localización de IgG, y cada mancha individual representa una célula individual secretora de IgG específica para el antígeno HLA. Las manchas azules representan IgG policlonal, dando un control positivo.

El protocolo detallado es el siguiente.

4.1 Recubrimiento

1. Diluir los AcM anti IgG de recubrimiento a 15 µg en 10 ml de PBS estéril, pH 7,4.
2. Retirar la placa Elispot (tipo S5EJ104107) del paquete y humedecer previamente con 50 µl de etanol al 70 % por pocillo durante un máximo de 2 minutos.
3. Lavar la placa 5 veces con agua estéril, 200 µl/pocillo. No permitir que la placa se seque durante este proceso. Si es así, repetir la etapa de prehumedecimiento.
4. Añadir 100 µl/pocillo de la solución de anticuerpo.
5. Incubar la placa durante la noche a 4 °C.

4.2 Preparación de la muestra

1. Aislar PBMC mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Pâque) y preparar células que responden al tratamiento y células estimuladoras.
2. Contar las células mediante hematocitómetro.
3. Ajustar la concentración celular a $1,5 \times 10^6$ en 1 ml de medio completo en un tubo falcon de 15 ml con una tapa con filtro.
4. Añadir R848 1 µg/ml e IrhIL-2 10 ng/ml.
5. Incubar a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 72 horas.

4.3 Incubación de células en placa

1. Lavar la placa 5 veces con 200 µl/pocillo con PBS estéril, para eliminar el exceso de anticuerpos.
2. Bloquear la microplaca mediante la adición de 200 µl/pocillo de medio completo.
3. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Lavar la placa con 200 µl/pocillo de PBS.

5. Lavar las células de los tubos de la incubadora ampliamente con PBS. Asegurarse de que no queda sobrenadante.
6. Contar las células y ajustar a la concentración adecuada.
7. Sembrar 5×10^4 células/pocillo por duplicado y realizar una dilución en serie de 2 veces hasta 2.500 células para la determinación de IgG total.
8. Sembrar $4,5 \times 10^5$ células/pocillo por triplicado, activar los estímulos específicos para HLA y asegurarse de tener el mismo número de pocillos de control negativo.
9. Cubrir la placa con papel de aluminio e incubar durante 20 horas a 37 °C en una incubadora con CO₂.

10 4.4 Detección de manchas

Las siguientes etapas se realizan bajo condiciones no estériles.

- Vaciar la placa para eliminar las células y lavar 5 x 200 µl/pocillo con PBS.

15 A. **Detección de manchas de IgG total.** Preparar la solución de anticuerpo marcado con biotina en 1 µg/ml de PBS.

1. Añadir 100 µl de solución de anticuerpo a cada pocillo
2. Incubar durante 2 horas a TA.

20 B. **Detección de manchas de IgG específicas de antígeno.**

Diluir cada HLA dextramer con 100 ng/ml de PBS.

1. Agregar 100 µl de solución de antígeno a cada pocillo (incluidos los pocillos de control negativo, los pocillos sin IgG y los pocillos sin células).
2. Envolver la placa en papel de aluminio e incubar a TA durante 2-4 horas.
3. Lavar la placa 5 veces con PBS.
4. Agregar 100 µl de estreptavidina diluida (1:1000) a cada pocillo de IgG total.
5. Agregar 100 µl de anti-FITC verde diluido 1:300 a cada pocillo de HLA.
6. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Filtrar la solución TMB (0,45 µm).
8. Lavar la microplaca con 5 x 200 µl/pocillo de PBS.
9. Agregar 100 µl de solución de sustrato TMB a cada pocillo de IgG total.
10. Agregar 100 µl de potenciador a cada pocillo específico para HLA.
11. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
12. Secar la placa durante la noche y contar las manchas en un Biolector ELISPOT.

40 C. Interpretación de datos

Se ha desarrollado y refinado un nuevo ensayo ELISPOT de linfocitos B que permite una enumeración precisa de la frecuencia de linfocitos B de memoria productores de anticuerpos específicos para HLA, mejorando varias características técnicas importantes del ensayo, lo que demuestra en última instancia su potencial para su uso en receptores de trasplante de riñón para determinar su estado de sensibilización humoral anti-donante:

1. La capacidad proliferativa de los linfocitos B circulantes en los linfocitos B de memoria secretores de anticuerpos se ha simplificado y mejorado significativamente, preservando estrictamente su repertorio original de antígenos mediante el uso de complementos estandarizados basados en IL-2 y el agonista R848 de TLR (Imidazoquinolina, Mabtech, Suecia), siguiendo un método recientemente informado (Jahnmatz et al., J. Immunol. Methods. 2013, 391(1-2): 50-59).
2. La capacidad de detección de los linfocitos B de memoria que producen anticuerpos (ASC) contra los antígenos específicos para HLA amplios se ha incrementado significativamente con una alta sensibilidad y reproducibilidad mediante la multimerización de proteínas HLA individuales. En este sentido, se utiliza un anticuerpo policlonal biotinilado específico para la IgG humana y un colorante fluorescente marcado (Fluorescent dye Enhancer. AID Diagnostika, Alemania), moléculas HLA-dextramer (HLA Dextramer marcado con Fitc. Immudex, Dinamarca), que permite una clara detección y visualización del punto de IgG anti-HLA utilizando un lector ELISPOT, lo que enumera ASC específicas para HLA.

Los pocillos de IgG total se utilizan como control positivo para cada sujeto en cada punto de tiempo; si una muestra genera respuestas de IgG totales bajas, la muestra debe volver a analizarse.

Los linfocitos B de memoria se definen como el número de ASC en los pocillos con células estimuladas después de la sustracción de las manchas detectadas en los pocillos de control negativo estimulados (medio solo).

65 Las ASC de linfocitos B de memoria específicos para antígenos HLA se ajusta a las ASC de linfocitos B de memoria de IgG total por estimulación, lo que permite el cálculo de la relación relativa.

EJEMPLO 2: Impacto de la evaluación de linfocitos B de memoria secretores de anticuerpos (ASC) específicos de donante mediante el ensayo ELISPOT de linfocitos B en pacientes con trasplante renal

Se ha evaluado la presencia de ASC específicas de HLA de donante en diferentes afecciones clínicas en receptores de trasplante de riñón.

1. Los individuos altamente sensibilizados contra múltiples antígenos específicos para HLA por medio de anticuerpos circulantes específicos para HLA en sangre periférica evaluados mediante LUMINEX también muestran una alta frecuencia de ASC específicas de HLA evaluadas mediante el ensayo ELISPOT (figuras 1 y 2).

2. No se detectaron ASC contra antígenos HLA propios después del proceso de proliferación y diferenciación de linfocitos B y, a pesar de estar altamente sensibilizados (figura 3). De nuevo, la secreción de IgG policlonal se puede encontrar en estos pacientes como un control correcto del ensayo de proliferación de ASC.

3. Algunos pacientes en lista de espera para un posterior aloinjerto renal y que no muestran anticuerpos circulantes específicos para HLA contra antígenos no coincidentes de HLA del injerto anterior muestran una alta frecuencia de ASC específicas de HLA evaluadas mediante el ensayo ELISPOT (figura 4). La Figura 4 muestra un paciente representativo que no muestra anticuerpos circulantes contra los antígenos HLA A11:01 y A24:02, que se expresaron en el aloinjerto renal anterior que este paciente había recibido y perdido 2 años antes, pero mostró frecuencias significativamente altas de ASC-IgG anti-A11:01 y anti-A24:02 específicas cuando se evaluó con el ensayo ELISPOT de linfocitos B (ambas manchas de IgG específicas para el antígeno HLA y se expresaron mediante la relación de ASC-IgG específica de HLA /ASC-IgG policlonal total).

4. Los pacientes sin evidencia de anticuerpos específicos de donante evaluados mediante LUMINEX antes del trasplante que experimentan rechazo mediado por anticuerpos (ABMR) después del trasplante muestran una alta frecuencia de ASC específica de donante ya antes del trasplante (figuras 5 y 6).

5. De forma interesante, las frecuencias de ASC específicas de donante no siempre se correlacionan significativamente con la intensidad de fluorescencia media (MFI) del anticuerpo específico de antígeno detectado evaluado mediante Luminex. Como se muestra en la figura 7, mientras que el paciente 1 muestra una correlación altamente positiva entre la MFI de cada anticuerpo de antígeno único y la frecuencia de cada ASC específica de antígeno, el paciente 2 no muestra dicha correlación en absoluto. Además, aunque todos los antígenos individuales se hubieran considerado positivos en el paciente uno (MFI > 2000), en el paciente 2 solo 1 de los 3 antígenos analizados se consideraron positivos a pesar de haber mostrado altas frecuencias detectables de ASC contra estos antígenos HLA.

EJEMPLO 3: Validación del ensayo ELISPOT de linfocitos B en una gran cohorte de pacientes con trasplante renal**Diseño del estudio**

Todos los pacientes incluidos en el estudio dieron su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio, y el comité de revisión institucional del Hospital Universitario de Bellvitge aprobó el estudio.

La evaluación de las frecuencias de ASC HLA-sp utilizando el recientemente desarrollado ensayo Elispot de linfocitos B se realizó mediante la evaluación de 278 antígenos diana HLA-sp de 89 muestras de sangre periférica (PB, de sus siglas en inglés) pertenecientes a 66 pacientes y 4 individuos sanos. De las 89 muestras de PB obtenidas, 9 se excluyeron del estudio debido a la insuficiente proliferación de ASC después de la estimulación *in vitro*.

Los principales datos demográficos de la población de estudio se ilustran en la tabla 1. Tal como se muestra, la población de estudio evaluada consistió en 26 pacientes altamente inmunizados y 10 pacientes no inmunizados en lista de espera para trasplante de riñón que fueron evaluados contra antígenos HLA específicos. Asimismo, se evaluaron 16 pacientes adultos con trasplante de riñón sometidos a ABMR en el momento del rechazo (n = 16) y antes del trasplante (n = 10). Asimismo, se evaluaron 7 pacientes altamente sensibilizados con HLA y 7 pacientes no sensibilizados que no desarrollan ABMR antes del trasplante. Los pacientes altamente inmunizados con HLA se definieron como pacientes que presentaban más del 50 % de anticuerpos reactivos frente a un grupo de antígenos (PRA) y ensayos en perlas en fase sólida. Por el contrario, los pacientes no inmunizados se identificaron como individuos sin evidencia actual o historial de anticuerpos circulantes utilizando los mismos ensayos, y no informaron ninguna evidencia clínica potencial de inmunización alogénica, como trasplantes previos, transfusiones de sangre o embarazos.

Detección y caracterización de aloanticuerpos

La selección de aloanticuerpos circulantes anti-HLA específicos de donante se realizó en muestras de suero acumuladas y sobrenadantes de cultivos de linfocitos B. Las especificidades de los anticuerpos contra los antígenos HLA de clase I y II se determinaron utilizando ensayos de perlas de flujo de antígeno único (One-lambda Inc.) en una plataforma Luminex.

Tabla 1. Principales características demográficas clínicas

Principales características clínicas y demográficas (pacientes con ABMR)	ABMR (N=16)	Sin ABMR (N=14)	
		Sensibilizados (N=7)	No sensibilizados (N=7)
Género (femenino, %)	8 (50)	4 (57)	1 (14,3)
Edad (años, media \pm DE)	52,9 \pm 12,3	49 \pm 8,1	48,2 \pm 15,3
Raza (Caucásica, %)	16 (100)	6 (85,7)	6 (85,7)
Tipo de TS de riñón (fallecido, %)	3 (18,7)	3 (42,8)	3 (42,8)
Trasplantes previos (media \pm DE) (intervalo)	1,3 \pm 0,75 (0-3)	1,3 \pm 0,48 (0-1)	0 (0)
Tiempo en diálisis antes del TS (meses)	18,9 \pm 12,6	19,4 \pm 10	12,1 \pm 10
Inducción IS (%)			
rATG/Basiliximab (%)	12(75)/4(25)	5(71,4)/2(28,6)	2(28,6)/5(71,4)
Plasmaféresis/IVIG (%)	2(12,5)/11(68,75)	1(14,3)/6(85,7)	0(0)/0(0)
Mantenimiento IS			
Basado en CNI (TAC/CsA) (%)	15(93,75)/1(6,25)	6(85,7)/1(14,3)	7(100)/0(0)
Tiempo medio de diagnóstico de ABMR (meses)	3,8 \pm 2,7	NAp	NAp
cPRA previa al trasplante (% medio \pm DE)	53 \pm 30	52,8 (24,78)	0 (0)
Prueba de histocompatibilidad de CDC previa al trasplante	Negativa	Negativa	Negativa
Extensión de la lesión de ABMR		NAp	NAp
- Rechazo vascular (sí/%)	7 (43,75)		
- TCMR (sí/%)	2 (12,5)		
- TCMR y rechazo vascular (sí/%)	0 (0)		
Lesiones histológicas de aloinjerto por compartimentos (puntuaciones de Banff), (media \pm DE; intervalo)		NAp	NAp
- Glomerulitis (ag)	1,75 \pm 1 (0-3)		
- Inflamación intersticial (ai)	1,7 \pm 0,7 (0-3)		
- Tubulitis (at)	1 \pm 0,7 (0-2)		
- Capilaritis peritubular (ptc)	1,8 \pm 1 (0-3)		
- Endotelialitis (av)	1 \pm 1,2 (0-3)		
- C4d+	1,4 \pm 0,8 (1-3)		

Pruebas de histocompatibilidad de citometría de flujo (FCXM, de sus siglas en inglés)

- 5 La prueba de histocompatibilidad de citometría de flujo (FCXM) se realizó para aquellos receptores de trasplante de riñón en los cuales las células del donante (ya sean linfocitos esplénicos o periféricos) y los sueros receptores estaban disponibles en el momento de la cirugía de trasplante. Para la FCXM, se mezclaron 100 μ l de una suspensión de células donantes de $2,5 \times 10^6$ células/ml con 20 μ l de los sueros de prueba y control apropiados. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a 4 °C, luego se centrifugaron y se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato frío. Luego se agregaron anticuerpos marcados por fluorescencia (3 μ l de PerCP anti-CD3, 3 μ l de ficoeritrina anti-CD19 y 20 μ l de una dilución de trabajo de F[ab]' FITC anti-IgG humana). Después de una incubación en ambiente oscuro de 20 minutos, se realizaron dos etapas de lavado con solución salina tamponada con fosfato, y los linfocitos se resuspendieron en 500 μ l de solución salina tamponada con fosfato con azida sódica al 0,05 % y se transfirieron a tubos para su análisis. Se realizó un análisis de citometría de flujo de tres colores con un instrumento FACSCalibur (BD Biosciences, Sp). Se activaron los linfocitos en función de sus características de avance y dispersión lateral. Con una escala que expresaba la intensidad de la tinción como un valor de canal lineal (0 a 1024), se cuantificó la fluorescencia del canal mediano para F(ab)' FITC anti-IgG humana en linfocitos T CD3+ y linfocitos B CD19+. Se identificó una prueba de histocompatibilidad positiva cuando la intensidad de fluorescencia media de la muestra superó la de los valores de control negativos en 3 DE. Las DE se derivaron mediante la realización de FCXM de control negativo con sueros de 10 machos no transfundidos AB negativos y linfocitos de 15 donantes sanos (datos no mostrados). Una FCXM de linfocitos T positiva y una FCXM de linfocitos B positiva representaron valores de cambio de canal medio de ≥ 40 y ≥ 100 , respectivamente.

Histología de aloinjerto renal

- 25 Las biopsias de aloinjerto renal utilizadas para caracterizar el rechazo mediado por anticuerpos se realizaron todas por una causa debida a una disfunción clínica de aloinjerto y se evaluaron siguiendo la clasificación de la puntuación de Banff.

Evaluación de los linfocitos B secretores de anticuerpos IgG de memoria específicos para HLA

Ensayo de estimulación de linfocitos B de memoria

5 Para inducir y diferenciar linfocitos B de memoria circulantes a células secretoras de anticuerpos (ASC), se cultivaron PBMC ($1,5 \times 10^6$ células/ml, a 37°C , en CO_2 al 5 %) durante 6 días en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) complementado con L-glutamina 2 mM), suero bovino fetal al 10 %, penicilina G 0,1 mg/ml (Britannia Pharmaceuticals®, Reino Unido), estreptomina 0,1 mg/ml (Sigma-Aldrich®, interleucina 2 humana recombinante 10 ng/ml (rhIL-2) (Mabtech®, Suecia), y agonista de receptores 7/8 R848 tipo Toll 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Mabtech®, Suecia). Después de dicha estimulación, los linfocitos B de memoria proliferan y se diferencian en ASC. Un número significativo de linfocitos B de memoria proliferaron y se diferenciaron en ASC. Después de un lavado minucioso, las células se utilizaron en los ensayos ELISPOT de linfocitos B para IgG.

Ensayo ELISPOT de linfocitos B para IgG específicos para HLA

15 Para la detección de frecuencias de células secretoras de anticuerpos IgG específicas de HLA (ASC-IgG específicas de HLA), se utilizó el sistema ELISPOT de linfocitos B para HLA recientemente desarrollado, con ligeras modificaciones. Brevemente, se sembraron $4,5 \times 10^5$ células del ensayo de estimulación de linfocitos B de memoria descrito anteriormente en 100 μl de triplicados de pocillos en placas Multiscreen de Elispot de PVDF (difluoruro de polivinilideno) recubiertas con IgG (Millipore®, Billerica, MA, EE.UU.) y se colocaron en placas en una incubadora a 37°C durante 24 horas. Se agregaron 100 μl de medio completo en pocillos separados y se utilizaron como controles negativos. Después de lavar cualquier célula y sustancia no unida, se añadió a cada pocillo un dextramer HLA de clase I y II marcado con colorante fluorescente (Immudex®, Dinamarca). Después de un lavado y la adición de 100 μl de dilución verde anti-FITC diluida, la visualización de manchas de color verde aparece en los sitios de localización de IgG, y cada mancha individual representa una ASC-IgG específica de HLA individual. Para la detección de ASC-IgG policlonal total, se siguió un protocolo descrito previamente (Jahnmatz et al., 2013, Methods 391:50-9). Brevemente, se sembraron $4,5 \times 10^4$ células por pocillo recubierto con anti-IgG y, después de una incubación de 24h a 37°C , un sistema de detección de sustrato de estreptavidina-fosfatasa alcalina (AP) y (BCIP) produjo manchas azules correspondientes a ASC-IgG policlonal. Las células formadoras de puntos se enumeraron posteriormente en modo semiautomático utilizando AID® ELISPOT Reader HR, 4ª generación.

Los pocillos de IgG policlonal total se utilizan como control positivo para cada sujeto por estimulación; si una muestra generó bajas respuestas de IgG policlonales totales (< 20 manchas de IgG policlonales/ $4,5 \times 10^4$ ASC), la muestra no se consideró para el estudio.

Las manchas inespecíficas detectadas en los pocillos de control negativo (medio solo), en su caso, se restaron del recuento de manchas específicas para HLA resultante. Las frecuencias de células formadoras de manchas IgG específicas para HLA dentro de las ASC-IgG policlonales totales se representaron como una relación (número de manchas HLA-sp/número de manchas de IgG policlonal) que permite una mejor caracterización de la proporción o mejora de clones de ASC-IgG HLA-sp dentro de la población completa de ASC-IgG, como se muestra en las Figuras 8A y 8B.

Análisis estadístico

45 Todos los datos se presentan como media \pm desviación estándar (DE). Los grupos se compararon utilizando la prueba χ^2 para las variables categóricas, el análisis de varianza de una vía (ANOVA) o la prueba de la f para los datos distribuidos normalmente, y la prueba U no paramétrica de Kruskal-Wallis o Mann-Whitney para las variables no distribuidas normalmente. Los análisis de correlación bivariada se realizaron con pruebas de Pearson o spearman para variables no paramétricas. Se realizó un análisis de las características operativas del receptor de sensibilidad/especificidad para evaluar la relación Elispot de linfocitos B anti-HLA de donante de corte más precisa (ASC-IgG específicas de donante/ASC-IgG policlonal) evaluada en el momento en que el ABMR agudo predice el advenimiento de lesiones vasculares agudas según la clasificación del puntaje de Banff (Figura 9). El nivel de significación estadística bilateral fue $p < 0,05$.

Resultados

1. El Elispot de linfocitos B específicos para HLA es altamente específico para detectar frecuencias de células secretoras de anticuerpos (ASC)-IgG específicas para HLA de clase I y II

60 Los pacientes altamente inmunizados con HLA se evaluaron con el recientemente desarrollado ensayo Elispot de linfocitos B para HLA para determinar la frecuencia de ASC-IgG HLA-sp contra diferentes antígenos HLA bien caracterizados de clase I y II específicos. Con esta técnica, se analiza la presencia de linfocitos B de memoria específicos para los antígenos HLA, ya que la fuente original de ASC son los linfocitos B de memoria. Como se muestra en la Figura 10A, se observó un amplio intervalo de frecuencias de ASC-IgG HLA-sp así como la relación de respuestas de ASC-IgG HLA-sp sobre ASC-IgG policlonales totales frente a los antígenos HLA de clase I y II dirigidos en todos los paciente sensibilizados. No se observaron frecuencias de ASC-IgG HLA-sp contra los propios antígenos de tipo

HLA en ningún individuo.

La misma evaluación entre individuos sanos y pacientes no inmunizados con HLA, no reveló evidencia de respuestas de ASC-IgG HLA-sp en sangre periférica (figura 10B). Todos los pacientes examinados mostraron un amplio intervalo de frecuencias de ASC-IgG policlonales, lo que demuestra la viabilidad de todas las ASC probadas.

Los Elispots de linfocitos B de IgG HLA-sp se confirmaron como anticuerpos específicos para HLA mediante su detección en los sobrenadantes correspondientes utilizando la plataforma Luminex.

2. Las altas frecuencias de las células secretoras de anticuerpos IgG específicas para HLA circulantes pueden detectarse independientemente de la presencia de anticuerpos específicos para HLA circulantes

A continuación, se intentó evaluar si había alguna asociación entre la frecuencia de ASC HLA-sp y la intensidad de Ac circulantes HLA-sp (MFI) en pacientes altamente sensibilizados con HLA. Como se muestra en la Figura 11, se observó una débil pero significativa correlación positiva entre las frecuencias ASC HLA-sp y las MFI de anticuerpos HLA-sp en el suero ($r = 0,31$), $p < 0,001$.

Cabe destacar que, las respuestas de ASC HLA-sp alorreactivas circulantes también podrían detectarse a pesar de los niveles bajos de MFI ($MFI < 1500$) e incluso en ausencia de anticuerpos HLA-sp circulantes en algunos casos evaluados, 42/136 (30,8 %). Como se muestra en la tabla 2, las principales variables inmunológicas asociadas a las respuestas de ASC HLA-sp en pacientes seronegativos con HLA (HLA-sp ASC+/HLA-sp Ab-), revelaron signos claros de sensibilización previa HLA-sp, ya sea mediante la detección de dichos aloanticuerpos en los puntos temporales anteriores o debido a la exposición anterior a dichos aloantígenos no coincidentes con HLA en aloinjertos renales fallidos anteriores, de manera similar a los pacientes seropositivos HLA-sp (HLA-sp ASC+/HLA-sp Ac+). Sin embargo, la intensidad de las frecuencias ASC HLA-sp y las MFI de anticuerpos HLA-sp fue significativamente mayor en pacientes con anticuerpos HLA-sp detectables en comparación con individuos seronegativos.

Tabla 2: Principales variables epidemiológicas e inmunológicas asociadas a las respuestas de linfocitos B de memoria HLA-sp en pacientes seronegativos IgG con HLA

Principales características inmunológicas	HLA-sp ASC+ y HLA-sp Ac+ (N = 67/136)	HLA-sp ASC+ y HLA-sp Ac- (N = 42/136)	Valor de p
MFI de HLA-sp Ac (media \pm DE)	8143,4 \pm 5341,4	440,5 \pm 453	< 0,001
HLA-sp ASC (media \pm DE)	0,38 \pm 0,2	0,22 \pm 0,2	0,007
ASC-IgG policlonal total (media \pm DE)	76,92 \pm 40	88,4 \pm 63,2	NS
Ac no coincidente con HLA alojado en aloinjertos de riñón anteriores (N/%)	52 (81 %)	30 (71 %)	NS
Detección previa de HLA-sp Ac (Sí,%)	50 (78 %)	29 (69 %)	NS

Abreviaturas: POS, positivo; NEG, negativo; HLA, antígenos leucocitarios humanos; Ac, anticuerpos, DSA, anticuerpos específicos de donante, MFI, intensidad de fluorescencia media; HLA-sp, específico para HLA; ASC-IgG, células secretoras de anticuerpos-IgG; Policl, policlonales; BCE, Elispot de linfocitos B, DE, desviación estándar.

3. Las ASC específicas para HLA pueden detectarse en pacientes sensibilizados contra antígenos HLA alojados en aloinjertos anteriores

Los pacientes trasplantados previamente se evaluaron para respuestas ASC HLA-sp contra antígenos HLA-sp alojados en aloinjertos anteriores. Como se observa en la Figura 12, se detectaron frecuencias de ASC HLA-sp contra ciertos antígenos HLA expresados en aloinjertos de riñón previos, incluso en pacientes trasplantados más de 20 años antes (pacientes #E, #G, #H), mientras que en algunos otros, no se observaron frecuencias de ASC HLA-sp (paciente #A). El tiempo de sensibilización o la duración del injerto en funcionamiento no se correlacionaron con la frecuencia ASC HLA-sp.

4. Los pacientes sometidos a rechazo mediado por anticuerpos (ABMR) muestran altas frecuencias de células secretoras de anticuerpos IgG específicas para HLA del donante en sangre periférica

Posteriormente, ASC circulantes del donante (d-s) específicas para HLA de los receptores de trasplante de riñón se analizaron en el momento de ABMR agudo ($n = 16$) y antes del trasplante ($n = 10$). Como se muestra en la Figura 13a y se detalla en la Tabla 3, durante el ABMR, todos los pacientes evaluados mostraron un amplio intervalo de frecuencias de ASC-HLA d-s alorreactivas detectables que se adaptan a la presencia de DSA correspondientes en el suero. De forma interesante, en un paciente (p n.º 9), mientras que solo se detectó 1 DSA circulante (DR11:01), el

Elispot de linfocitos B reveló la presencia de un clon de ASC d-s alorreactivo adicional que circula en sangre periférica que se había observado previamente en la circulación (DR11:01 y también A24:02).

5 La evaluación de las respuestas de ASC d-s antes del trasplante se podría realizar en 10/16 pacientes que desarrollan ABMR. Además, 7 trasplantes altamente sensibilizados (pacientes n.º 17 a n.º 23) así como 7 no sensibilizados (pacientes n.º 24 a n.º 30) que no desarrollaron ABMR también se evaluaron por la presencia de frecuencias de ASC d-s antes del trasplante. Como se muestra en la figura 13B, la mayoría de los pacientes que desarrollaron ABMR no mostraron DSA correspondientes en el suero antes del trasplante, mientras que la mayoría de ellos mostraron frecuencias detectables de HLA-ASC d-s en la periferia. De manera destacable, como se muestra en la tabla 3, los
10 pacientes con respuestas de ASC d-s preformadas, mostraron características obvias de sensibilización alogénica previa. A tener en cuenta, el único paciente sin respuestas de ASC d-s detectables antes del trasplante y sin DSA (p n.º 4), no mostró patrones previos de sensibilización con HLA. Por el contrario, las frecuencias DSA y HLA-ASC d-s circulantes no se detectaron antes del trasplante en individuos no sensibilizados, así como en la mayoría de los individuos altamente sensibilizados con HLA que no desarrollaron ABMR temprano (0/7 frente a 1/7 frente a 9/10, p <
15 0,001). Sorprendentemente, un paciente altamente sensibilizado (n.º 17) que recibió un aloinjerto de riñón previo mostró ASC d-s detectables antes del trasplante contra 1 antígeno no coincidente con HLA de donante evaluado.

Además, cuando el sobrenadante de los linfocitos B de memoria alorreactivos expandidos se probó para determinar su especificidad de donante mediante el análisis de citometría de flujo, se obtuvieron pruebas de histocompatibilidad de flujo de linfocitos T y B positivas.
20

Tabla 3: Evaluación de las frecuencias de ASC-IgG HLA-sp de donante

Paciente	Tipo de HLA del receptor y tipos de HLA del donante	HLA-Ac (DSA)	Número de TS previo	PRA más alto antes del TS (%)	DSA en cualquier momento antes del TS (MFI)	DSA alojados en TS previo	ABMR temprano después del trasplante		Pre-TS (relación)	
							MFI de Ac	relación)		
Pac. n.º 1	R: A02 A24; B07 B15; DR01	A11:01	1	29	Sí (5289)	Sí	4929	0,15	5289	0,26
	D: A11 A32; B47 B60; DR01									
Pac. n.º 2	R: A29 A69; B35 B44; DR07	A24:02	1	90	No (250)	No	2039	0,45	483	0,30
	DR11									
Pac. n.º 3	cD: A02 A24; B18 B51; DR03	A11:01	1	62	Sí (11652)	No	9644	0,30	747	0,12
	DR13									
Pac. n.º 4	R: A02 A34; B07 B08; DR01	DR11:01	0	0	No (150)		1200	0,40	200	0
	DR03									
Pac. n.º 5	cD: A02 A03; B08 B18; DR03	A24:02	3	40	Sí (2480)	No	2842	0,40	100	0,40
	DR15									
Pac. n.º 6	cD: A23 A24; B07 B44; DR07	DR11:01	1	90	Sí (3001)	Sí	9093	0,65	1750	0,20
	DR11									
Pac. n.º 7	R: A01 A29; B44 B17; DR03	A11:01	3	96	Sí (7255) Sí (18300)	No	4521	0,3	811	0,2
	DR07									
Pac. n.º 8	cD: A01 A03; B44 B45; DR04	B27:05	1	34	Sí (1959)	No	1510	0,52	1959	0,54
	DR01									
Pac. n.º 9	R: A02 A11; B07 B35; DR01	A02:01	1	42	Sí (2255) Sí (11433)	No	364	0,62	67	0,617
	DR15									
Pac. n.º 10	cD: A02 A33; B14 B35; DR15	A24:02	1	77	Sí (13303)	No	9545	0,8	1106	0,2
	DR16									
Pac. n.º 10	R: A32 A33; B37 B38; DR01	A24:02	1	42	Sí (2255) Sí (11433)	No	364	0,62	67	0,617
	DR10									
Pac. n.º 10	cD: A24 A31; B35 B39; DR04	DR11:01	1	77	Sí (13303)	No	9545	0,8	1106	0,2
	DR11									
Pac. n.º 10	R: A25 A29; B35 B49; DR07-	A24:02	1	77	Sí (13303)	No	9545	0,8	1106	0,2
	cD: A24 A30; B13 B18; DR01									
Pac. n.º 10	DR07	A24:02	1	77	Sí (13303)	No	9545	0,8	1106	0,2
	DR07									

Pac. n.º	R: A25 A30; B18; DR15 DR03 cD: A02 A33; B14 B18; DR15 DR04	A02:01	0	0	No	No	6726	0,70	ND	ND
Pac. n.º 11	R: A01 A03; B35 B44; DR03 DR04 cD: A11 A30; B18 B44; DR03 DR07	A11:01	1	25	ND	No	2754	0,15	ND	ND
Pac. n.º 12	R: A02; B41 B51; DR13- cD: A02 A24; B07 B51; DR05 DR06	A24:02	0	0	No	No	8640	0,17	ND	ND
Pac. n.º 13	R: A02; B40 B51; DR08 DR13 cD: A02 A11; B15 B52; DR08 DR15	A11:01	1	20	ND	No	6345	0,13	ND	ND
Pac. n.º 14	R: A01 A31; B51 B07; DR11 DR12 cD: A01 A03; B07 B56; DR04 DR11	A03:01	1	59	Sí (1850)	No	1429 9	0,17	ND	ND
Pac. n.º 15	R: A03 A34; B14 B50; DR11 DR14 cD: A03 A32; B18 B35; DR30 DR13	B35:01	1	61	Sí (7199)	Sí	1615	0,34	ND	ND
Pacientes con trasplante renal altamente sensibilizados por HLA que NO desarrollan ABMR después del trasplante										
Pac. n.º 17	R: A02 A03; B44; DR04 DR08 cD: A03 A11; B27 B44; DR04 DR14	A11:01 B27:05	1	75	No	No	NAP	NAP	150	0,09 0,19
Pac. n.º 18	R: A24 A30; B15 B27; DR08 DR11 cD: A11-; B15 B38; DR01 DR11	A11:01	1	55	No	No	NAP	NAP	128	0,10
Pac. n.º 19	R: A24 A29; B45 B50; DR04 DR15 cD: A01 A31; B08 B45; DR03 DR04	A01:01	0	25	No	No	NAP	NAP	560	0,002
Pac. n.º 20	R: A03 A25; B07 B18; DR04 DR11 cD: A11 A29; B35 B49; DR04 DR11	A11:01	1	30	No	No	NAP	NAP	178	0,06
Pac. n.º 21	R: A02 A03; B27 B44; DR04 DR13 cD: A02 A68; B51-; DR13-	A68:01	0	82	No	No	NAP	NAP	1503	0,10
Pac. n.º 22	R: A03; B07 B35; DR01 DR15 cD: A02 A23; B07 B18; DR01 DR15	A02:01	0	64	No	No	NAP	NAP	166	0,04

Pac. n.º	R: A02 A68; B38 B52; DR08 DR13 cD: A02 A24; B07 B40; DR08 DR15	A24:02 B07:02	0	86	No No	-	NAP	NAP	462 379	0,04 0,02
Pacientes con trasplante renal no sensibilizados por HLA que NO desarrollan ABMR después del trasplante										
Pac. n.º 24	R: A02 A24; B15 B40; DR07 DR11 cD: A01 A03; B14 B49; DR07 DR11	A01:01 A03:01	0	0	No No	-	NAP	NAP	Neg*	0,02 0,01
Pac. n.º 25	R: A68- B35 B44; DR11- cD: A01 A32; B35 B40; DR11 DR13	A01:01	0	0	No		NAP	NAP	Neg*	0,06
Pac. n.º 26	R: A02 A24; B38 B51; DR11 DR14 cD: A24 A68; B38 B44; DR13 DR14	A68:01	0	0	No		NAP	NAP	Neg*	0,01
Pac. n.º 27	R: A02 A32; B52 B57; DR11 DR15 cD: A02 A68; B44 B51; DR04 DR11	A68:01	0	0	No		NAP	NAP	Neg*	0,01
Pac. n.º 28	R: A02 A24; B39 B51; DR13 DR16 cD: A02-; B44 B51; DR07 DR11	DR11:01	0	0	No		NAP	NAP	Neg*	0,09
Pac. n.º29	R: A24 A32; B18 B38; DR01 DR13 cD: A02-; B18 B51; DR03 DR09	A02:01	0	0	No		NAP	NAP	Neg*	0,06
Pac. n.º 30	R: A02 A24; B38 B44; DR03 DR15 cD: A01 A24; B18 B57; DR07 DR11	A01:01 DR11:01	0	0	No No	-	NAP	NAP	Neg*	0,08 0,01

Abreviaturas: Pac., paciente; HLA, antígenos leucocitarios humanos; Ac, anticuerpos, DSA, anticuerpos específicos de donante, MFI, intensidad de fluorescencia media; HLA-sp, específico para HLA; BCE, Elispot de linfocitos B; ND, no disponible. Los antígenos HLA coincidentes donante-receptor se muestran subrayados. En negrita y resaltados con un asterisco se muestran los anticuerpos específicos del donante (DSA).

5. Las altas frecuencias de los linfocitos B de memoria específicos de donante se asocian con ABMR vasculares graves

El análisis de las puntuaciones histológicas de Banff en los glomérulos, túbulos, intersticio y capilares peritubulares en relación con la intensidad de la respuesta de ASC d-s no reveló ninguna asociación entre ellos (datos no mostrados). Por el contrario, se observó una correlación positiva significativamente fuerte entre las lesiones vasculares agudas (av) y las frecuencias de ASC ($r = 0,73$, $p = 0,001$). Un análisis de componentes principales (PCA) no supervisados que tiene en cuenta la presencia de lesiones vasculares agudas y las frecuencias de ASC d-s, segregó a los pacientes en 2 grupos; pacientes con lesiones de endarteritis y respuestas de ASC d-s altas y pacientes sin lesiones vasculares agudas y respuestas de ASC d-s bajas (mapeo de PCA = 62,3%) (figura 14). Un análisis de la curva ROC de sensibilidad/especificidad de las frecuencias de ASC d-s para la predicción de endarteritis, mostró que las frecuencias de ASC d-s superiores a 0,35 predijeron con precisión la presencia de endarteritis en pacientes con ABMR (figura 4 complementaria). utilizando este corte, 7/10 (70 %) de pacientes con alto grado de alorreactividad de ASC en el momento del ABMR mostraron endarteritis en comparación con solo 1/6 (16,6 %) de pacientes con alorreactividad de ASC bajo ($p = 0,039$). De manera similar, pero antes del trasplante, 5/5 (100 %) de los pacientes con ASC alorreactivas d-s altas mostraron endarteritis, mientras que solo 1/4 (25 %) con ASC alorreactivas bajas desarrollaron endarteritis ($p = 0,01$).

Para investigar más a fondo si la intensidad de la respuesta aloinmunitaria de memoria HLA-sp tuvo algún impacto en el tipo o la gravedad del ABMR, se realizó un análisis de componentes principales sin supervisión teniendo en cuenta 4 variables: la presencia o ausencia de lesiones vasculares agudas concomitantes (av) y la intensidad de las frecuencias de ASC-IgG HLA-sp del donante antes y durante el ABMR agudo (ASC-IgG alta o baja específica de donante/ASC-IgG policlonal). Se reveló que las proporciones de ASC-IgG HLA-sp de donante/ASC-IgG policlonal mayores de 0,35 predecían con precisión la aparición de lesiones de endarteritis en pacientes sometidos a ABMR (figura 14). Como se muestra en la Figura 14, se identificaron dos fenotipos diferentes: los pacientes con alorreactividad de linfocitos B de memoria específicos de donante mostraron más lesiones vasculares agudas concomitantes en comparación con los pacientes con respuestas de linfocitos B de memoria más bajas en el momento del rechazo, tanto antes como durante el ABMR agudo (durante el ABMR: 6/8 pacientes con alorreactividad alta mostraron endarteritis en comparación con solo 1/7 pacientes con alorreactividad de linfocitos B baja, $p = 0,019$; Pre-trasplante: los 4 pacientes con alorreactividad anti-linfocitos B de donante pre-TS alta mostraron lesiones de endarteritis en comparación con solo 1/4 de los pacientes con alorreactividad de linfocitos B baja, $p = 0,028$).

EJEMPLO 4: Estimulación de linfocitos B de memoria circulantes utilizando células mononucleares de sangre periférica o linfocitos B purificados

El proceso de estimulación de los linfocitos B de memoria circulantes que utilizan el agonista de TLR R848 y la IL-2 produce la misma cantidad de ASC y frecuencias de ASC-IgG específicas para HLA cuando se utilizan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o linfocitos B purificados. Los linfocitos B se purificaron como se describe en otro lugar (Heidt et al., 2012, citado *supra*), con un agotamiento parcial de los linfocitos T y, posteriormente, se estimularon utilizando el agonista de TLR R848 y la IL-2 como se describió anteriormente. La Tabla 4 y la Figura 15 muestran los resultados obtenidos con PBMC o linfocitos B purificados de dos pacientes sensibilizados con HLA-A02:01 (P n.º 1 y P n.º 2) estimulados con R848 e IL-2. Tal como se muestra, se obtuvo un porcentaje muy similar de ASC (Tabla 4) así como una frecuencia equivalente de ASC productoras de IgG específica para HLA A02:01 (Figura 15) cuando se utilizaron linfocitos B purificados o PBMC.

Tabla 4: Rendimientos de ASC después de la estimulación de linfocitos B purificados o PBMC con R848 e IL2

Tipo de estimulación celular	Pacientes	Fuente celular para la estimulación	Porcentaje de ASC (CD20 ^{bajo} CD27 ⁺ CD38 ⁺⁺ IgD ⁻ /linfocitos B (CD19 ⁺))
R848 + IL2	Paciente n.º 1	Linfocitos B purificados	0,61 %
		PBMC	0,55 %
	Paciente n.º 2	Linfocitos B purificados	0,84 %
		PBMC	0,82 %

EJEMPLO 5: Detección múltiple de especificidades de anticuerpos HLA en un solo pocillo

Se utilizaron diferentes moléculas HLA multimerizadas marcadas con fluorocromo en un ensayo multiplex para la detección de linfocitos B de memoria específicos para HLA capaces de producir anticuerpos específicos para HLA con diferentes especificidades en un solo pocillo ELISPOT. Se desarrolló el siguiente protocolo para este ensayo múltiple:

5.1. Preparación de la muestra (día 0)

1. Aislar PBMC MEDIANTE centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Pâque) y resuspender las células en

medio completo, RPMI++.

2. Contar las células mediante hematocitómetro.

3. Ajustar la concentración celular a $1,5 \times 10^6$ en 1 ml de medio completo en un tubo falcon de 15 ml con una tapa con filtro de ventilación.

5 4. Añadir R848 1 $\mu\text{g/ml}$, IL-2 10 ng/ml .

5. Incubar a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 6 días.

5.2. Revestimiento de placa (día 5)

10 1. Diluir los AcM anti IgG de recubrimiento a 15 $\mu\text{g/ml}$ de PBS estéril, pH 7,4.

2. Retirar las placas Elispot (tipo S5EJ104I07 y MAIPSWU10) del paquete y humedecer previamente con 50 μl de etanol al 70 % por pocillo durante un máximo de 2 minutos.

3. Lavar la placa x5 con 200 $\mu\text{l/pocillo}$ de agua esterilizada. No permitir que la placa se seque durante este proceso. Si es así, repetir la etapa de humedecimiento previo.

15 4. Añadir 100 $\mu\text{l/pocillo}$ de la solución de anticuerpo 15 $\mu\text{l/ml}$.

5. Incubar la placa durante la noche a 4 °C.

5.3. Siembra de placa (día 6)

20 1. Lavar la placa x5 con 200 $\mu\text{l/pocillo}$ con PBS estéril para eliminar el exceso de anticuerpo.

2. Bloquear la microplaca mediante la adición de 200 $\mu\text{l/pocillo}$ de medio completo (RPMI++).

3. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

4. Lavar la placa con 200 $\mu\text{l/pocillo}$ de PBS.

25 5. Lavar las células de los tubos de la incubadora ampliamente con RPMI++ (asegurarse de que no queda sobrenadante).

6. Contar las células y ajustar a la concentración adecuada.

7. Sembrar 4.500 células/pocillo por duplicado en la placa recubierta con IgG no fluorescente para la determinación de IgG total.

30 8. Sembrar 450.000 células/pocillo por duplicado en la placa recubierta con IgG fluorescente para la detección de IgG específica para HLA.

9. Cubrir las placas con papel de aluminio e incubar durante 20 horas a 37 °C en una incubadora con CO₂.

5.4 Detección de manchas

35 1. **Detección de manchas de IgG totales.** Preparar la solución de anticuerpo marcado con biotina en 1 $\mu\text{g/ml}$ de PBS.

2. **Detección de manchas de IgG específicas de antígeno.** Diluir HLA-Dextramer a 100 ng/ml . (4 μl de dextramer/100 μl de PBS).

3. Vaciar la placa para eliminar las células y lavar 5 x 200 $\mu\text{l/pocillo}$ con PBS.

40 4. Añadir 100 μl de solución de anticuerpo marcado con biotina a cada pocillo.

5. Añadir 100 μl de solución FITC-HLA-Dextramer a cada pocillo.

6. Envolver ambas placas en papel de aluminio e incubar a TA durante 2-4 horas.

7. Lavar las placas 5 veces con PBS.

9. Añadir 100 μl de estreptavidina-ALP diluida 1:1000 en PBS, a cada pocillo de IgG total.

45 10. Incubar ambas placas durante 1 hora a temperatura ambiente.

11. Añadir 100 μl de solución PE-HLA-Dextramer a cada pocillo.

12. Envolver ambas placas en papel de aluminio e incubar a TA durante 2-4 horas.

13. Lavar las placas 5 veces con PBS.

14. Filtrar la solución BCIP (0,45 μm) (utilizar a temperatura ambiente).

50 15. Añadir 100 μl de solución de sustrato BCIP por pocillo en la placa de IgG total.

16. añadir 100 μl de Enhancer por pocillo en una placa fluorescente HLA-IgG.

17. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

18. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

19. Secar la placa durante la noche en la oscuridad y contar los puntos en un Bioreader.

55 En un ensayo, se utilizaron dos dextramers HLA marcados con fluorocromos diferentes para enumerar la presencia de células productoras de anticuerpos específicos de A02:01 y DR11:01 en un solo pocillo Elispot. Se utilizaron fluorocromos FITC y PE para detectar los diferentes clones de linfocitos B de memoria HLA-sp en un solo pocillo (datos no mostrados).

60 **EJEMPLO 6: La estimulación de PBMC con IL-2 y un AcM CD40 permite la detección de células productoras de anticuerpos específicas para HLA**

65 La utilización de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 (Clone n.º 82111, R&D systems, Mineápolis, MB, EE.UU.), en lugar de R848, e IL-2 permite la diferenciación de linfocitos B de memoria específicos para HLA circulantes a células secretoras de anticuerpos específicas de HLA después de un cultivo de 3 días. La Figura 16 muestra que los linfocitos

B de memoria específicos para HLA capaces de producir anticuerpos IgG específicos para HLA se detectan claramente utilizando el ensayo Elispot de linfocitos B para HLA después de un cultivo de diferenciación de linfocitos B de memoria de 3 días.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para detectar linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA en un sujeto que comprende:
- 5
- i) estimular los linfocitos B de memoria en una muestra que contiene linfocitos B de memoria de dicho sujeto,
 - ii) capturar los anticuerpos secretados por los linfocitos B de memoria estimulados de la etapa (i) con un anticuerpo específico para IgG o IgM,
 - iii) poner en contacto los anticuerpos capturados en la etapa (ii) con al menos un multímero HLA de dicho HLA y
 - iv) detectar el multímero HLA de dicho HLA unido a los anticuerpos capturados en la etapa (ii).
- 10
2. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el valor obtenido en la etapa (iv) se normaliza al nivel de anticuerpos totales presentes en la muestra.
- 15
3. El método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la etapa de estimulación (i) se lleva a cabo mediante la incubación de la muestra que contiene linfocitos B en presencia de IL-2 y al menos un compuesto seleccionado de un agonista de TLR y un anticuerpo anti-CD40, opcionalmente, en el que el agonista de TLR es un agonista de TLR-7/8 y, opcionalmente, en el que el agonista de TLR-7/8 es R848.
- 20
4. El método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:
- (a) la muestra es una muestra de sangre periférica que contiene células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o una muestra que contiene linfocitos B purificados;
 - (b) el multímero HLA es una molécula polimérica a la que se une una pluralidad de moléculas de dicho HLA, opcionalmente, en el que la molécula polimérica es un dextrano;
 - (c) se une un marcador al multímero HLA; y/o
 - (d) los anticuerpos capturados en la etapa (ii) se ponen en contacto en la etapa (iii) con al menos dos multímeros HLA, en el que el tipo de moléculas de HLA contenidas en cada uno de dichos al menos dos multímeros HLA es diferente, opcionalmente, en el que se une un marcador diferente a cada uno de los al menos dos multímeros HLA.
- 25
- 30
5. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el marcador es una molécula de fluorocromo, opcionalmente, en el que la molécula de fluorocromo se selecciona de isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina y R-ficoeritrina (PE).
- 35
6. Un método *in vitro* para determinar el riesgo de que un sujeto tenga rechazo humoral después de un trasplante alogénico de órganos o tejidos, que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA utilizando el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho HLA está presente en el órgano o tejido trasplantado o en el órgano o tejido que se va a trasplantar y en el que los niveles aumentados de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para dicho HLA en relación con un valor de referencia son indicativos de que dicho sujeto tiene un alto riesgo de rechazo humoral, opcionalmente, en el que el trasplante de órgano es un trasplante de riñón.
- 40
7. Un método *in vitro* para determinar el riesgo de que un sujeto sufra endarteritis asociado con un rechazo humoral postrasplante después de un trasplante alogénico de órganos o tejidos, que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA utilizando el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho HLA está presente en el órgano o tejido trasplantado o en el órgano o tejido que se va a trasplantar y en el que niveles aumentados de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para dicho HLA en relación con un valor de referencia son indicativos de que dicho sujeto tiene un alto riesgo de sufrir endarteritis asociada con el rechazo humoral posterior al trasplante, opcionalmente, en el que el trasplante de órgano es un trasplante de riñón.
- 45
- 50
8. Un método *in vitro* para seleccionar a un sujeto para recibir un trasplante alogénico de órganos o tejidos que comprende detectar en una muestra de dicho sujeto los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos un HLA utilizando el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho HLA está presente en el órgano o tejido que se va a trasplantar y en el que el sujeto se selecciona para recibir dicho trasplante alogénico de órganos o tejidos si se detectan niveles disminuidos de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para dicho HLA en relación con un valor de referencia, opcionalmente, en el que el trasplante de órgano es un trasplante de riñón.
- 55
9. Un método *in vitro* para determinar la presencia de sensibilización humoral contra al menos un HLA en un sujeto que comprende detectar los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para dicho HLA utilizando el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la detección de un linfocito B secretor de anticuerpos específico para dicho HLA es indicativa de que dicho sujeto tiene una sensibilización humoral contra dicho HLA.
- 60
- 65

- 5 10. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 9, en el que si se detecta un linfocito B secretor de anticuerpos específicos para dicho HLA, el método comprende adicionalmente una etapa de correlación de los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para dicho HLA o la relación de linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para al menos dicho HLA sobre los linfocitos B secretores de anticuerpos totales con un grado de sensibilización humoral.
11. Un kit para detectar linfocitos B secretores de anticuerpos específicos para un HLA en una muestra que comprende linfocitos B que comprenden un anticuerpo específico para IgG o IgM y al menos un multímero HLA.
- 10 12. El método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el kit de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el anticuerpo específico para IgG o IgM está inmovilizado sobre una superficie sólida.
- 15 13. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, que comprende además IL-2 y/o un agonista de TLR y/o un anticuerpo anti-CD40, opcionalmente, en el que el agonista de TLR es un agonista de TLR-7/8 y, opcionalmente, en el que el agonista de TLR-7/8 es R848.
14. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que:
- 20 (a) el multímero HLA es una molécula polimérica a la que se une una pluralidad de moléculas de dicho HLA, opcionalmente, en el que el polímero es un dextrano; y/o
(b) se une un marcador al multímero HLA.
- 25 15. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que comprende al menos dos multímeros HLA de diferentes HLA, opcionalmente, en el que se une un marcador diferente a cada uno de los al menos dos multímeros HLA de diferentes HLA, opcionalmente, en el que el marcador es una molécula de fluorocromo y, opcionalmente, en el que la molécula de fluorocromo se selecciona de isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina y R-ficoeritrina (PE).

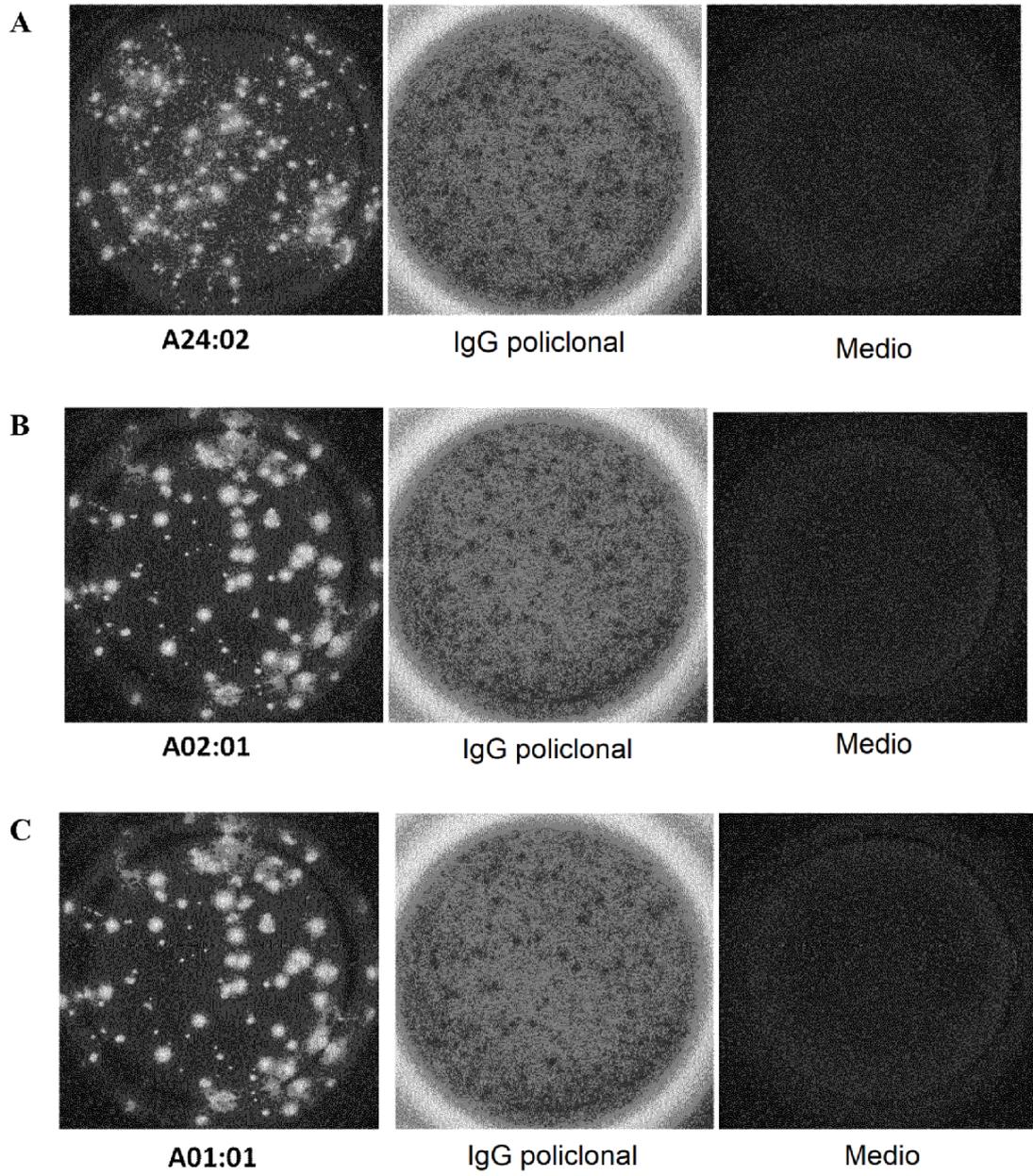
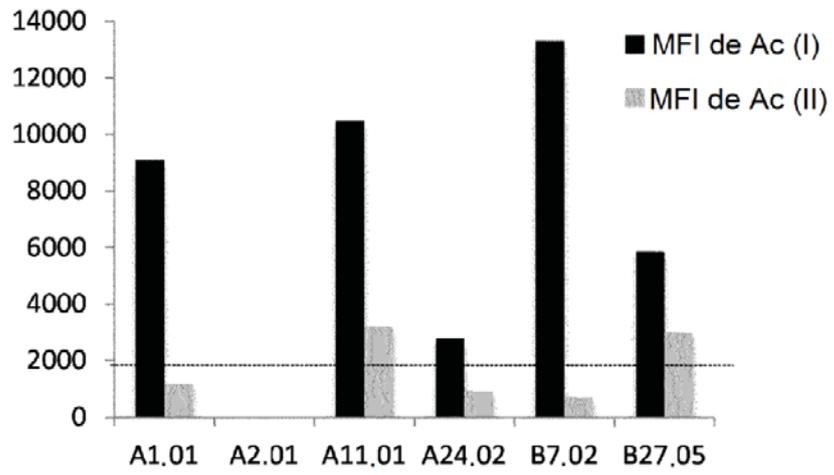


FIG. 1

A

Paciente N.º 1 (A02,A03 B44, DR01,DR15)



B

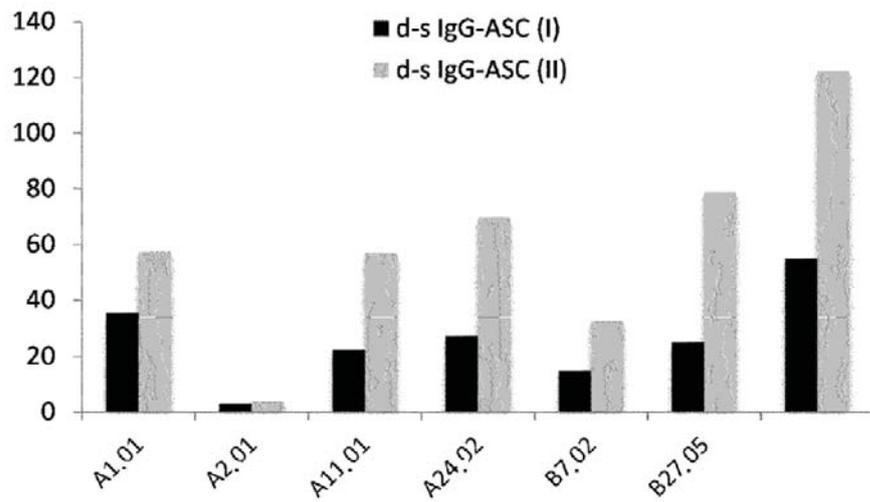


FIG. 2

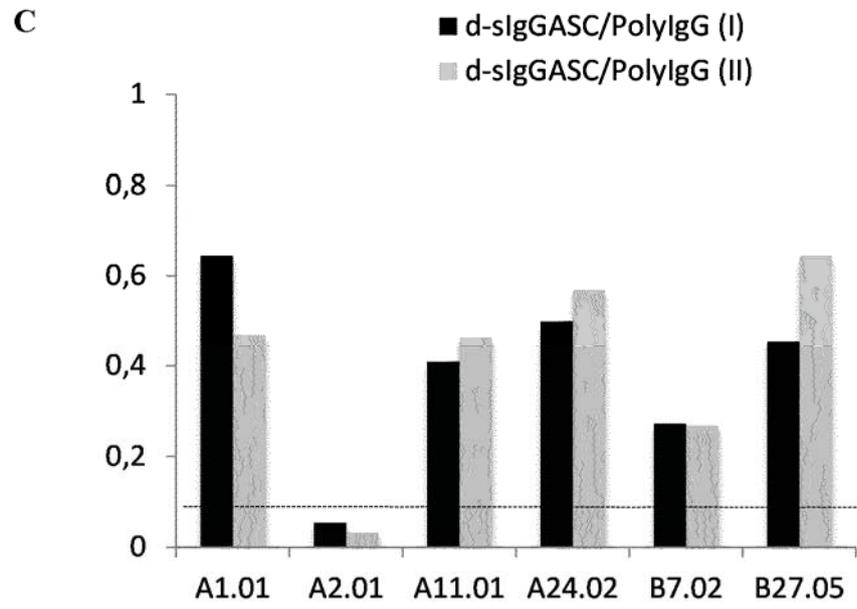


FIG. 2 (CONT.)

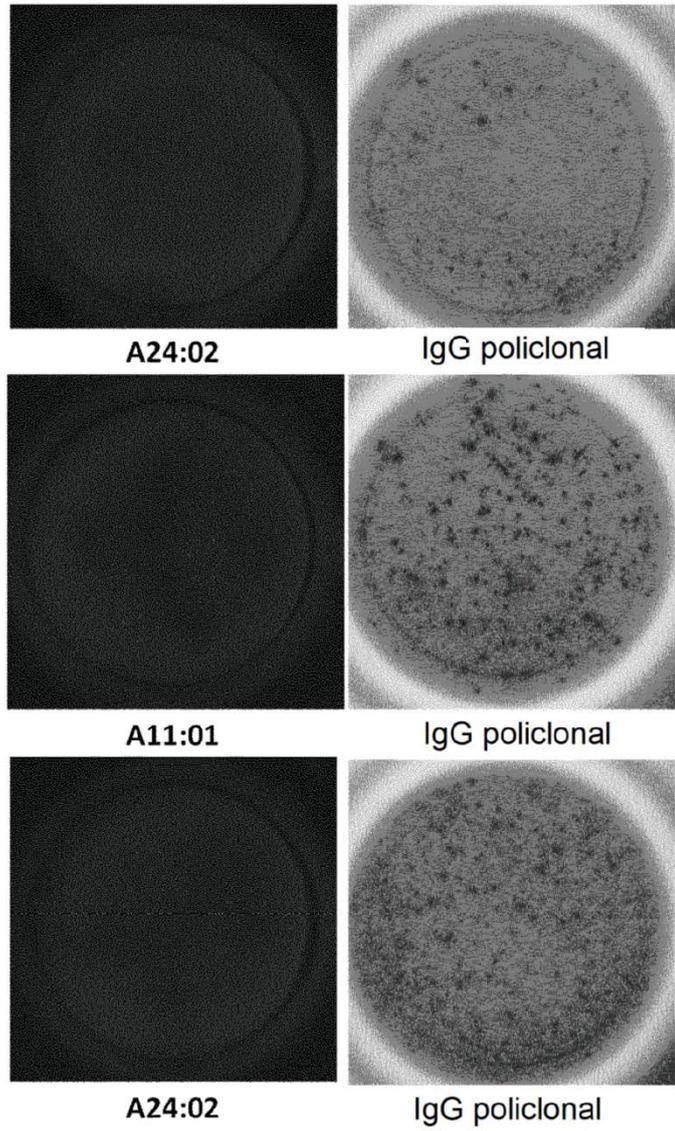
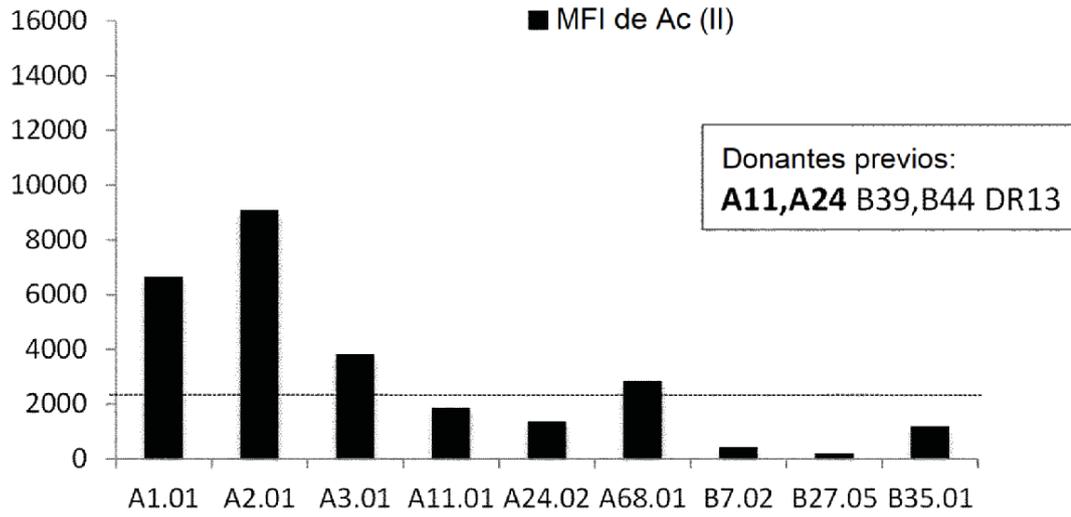


FIG. 3

A

Paciente N.º 2 (A29,A32 B7,B44 DR7,DR15)



B

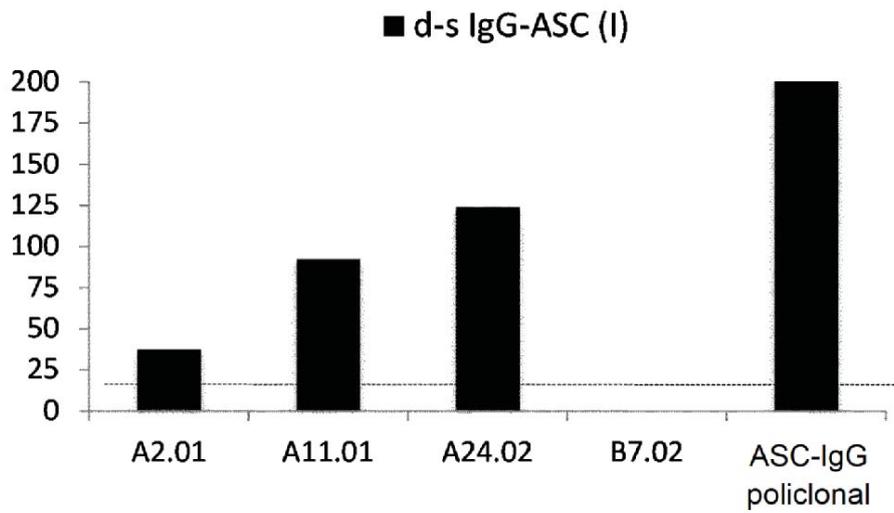


FIG. 4

C

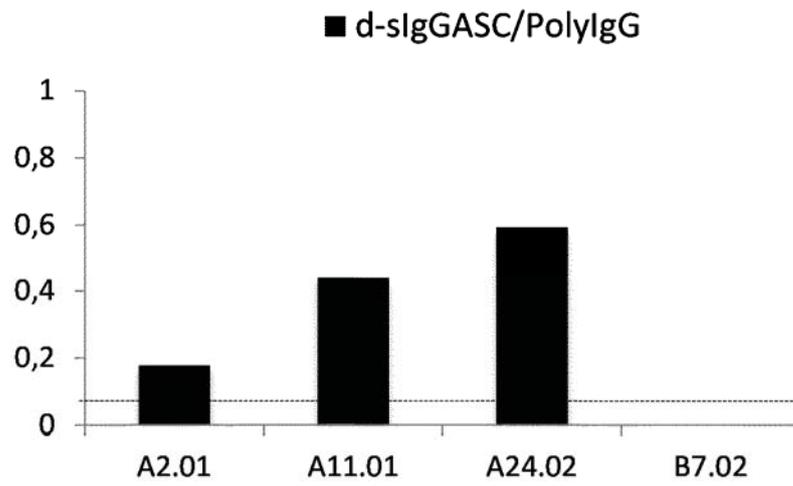


FIG. 4 (CONT.)

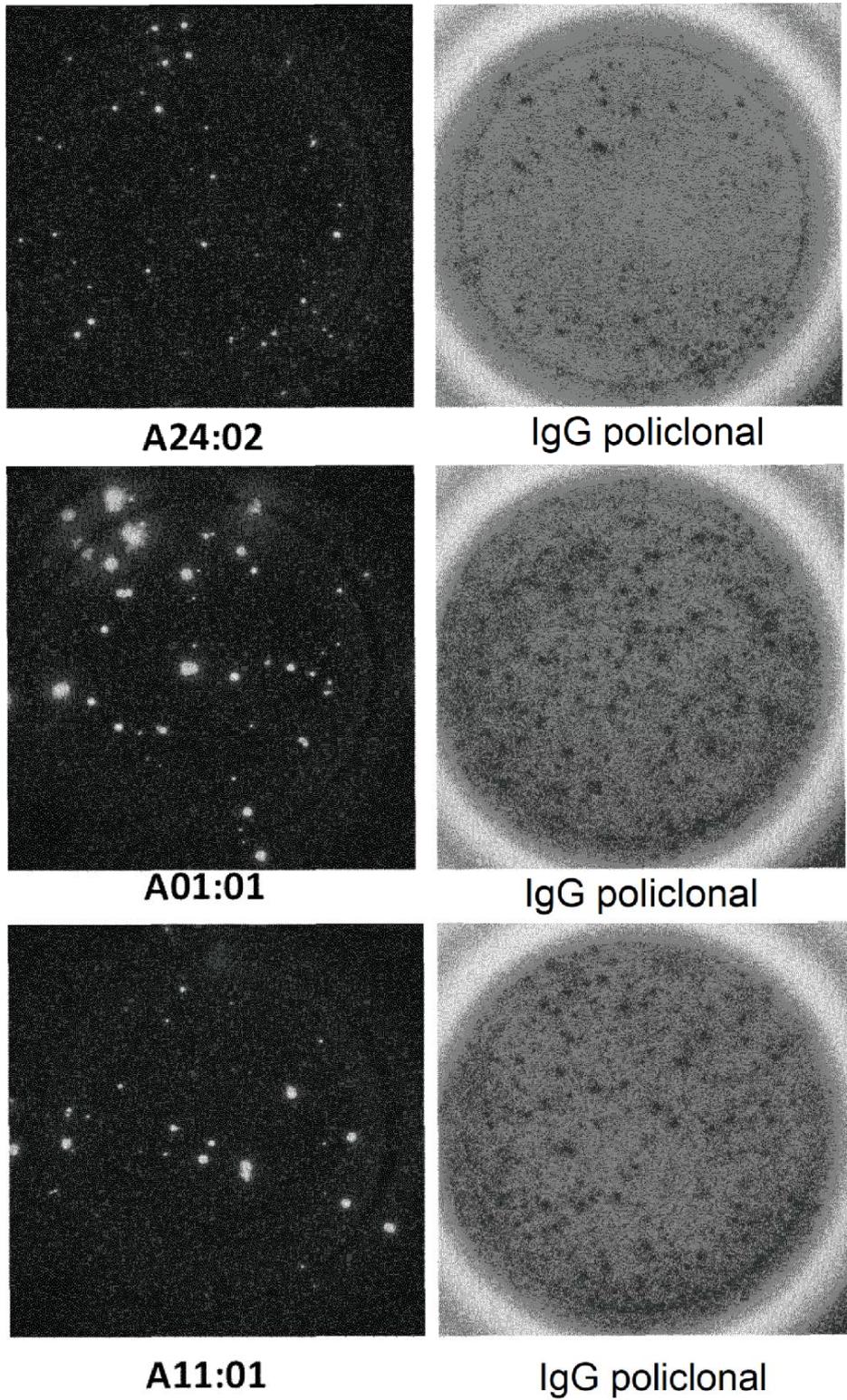


FIG. 5

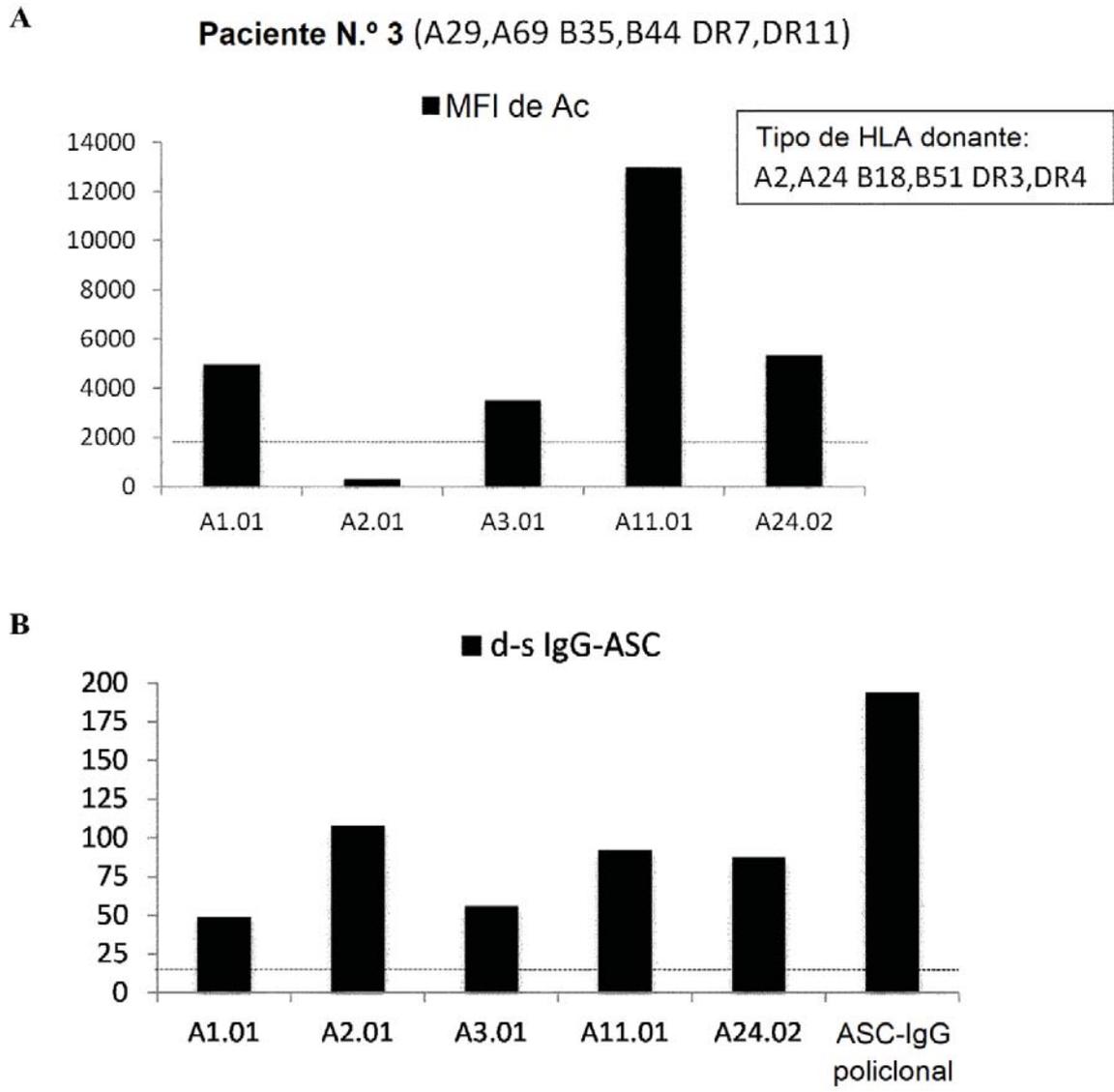


FIG. 6

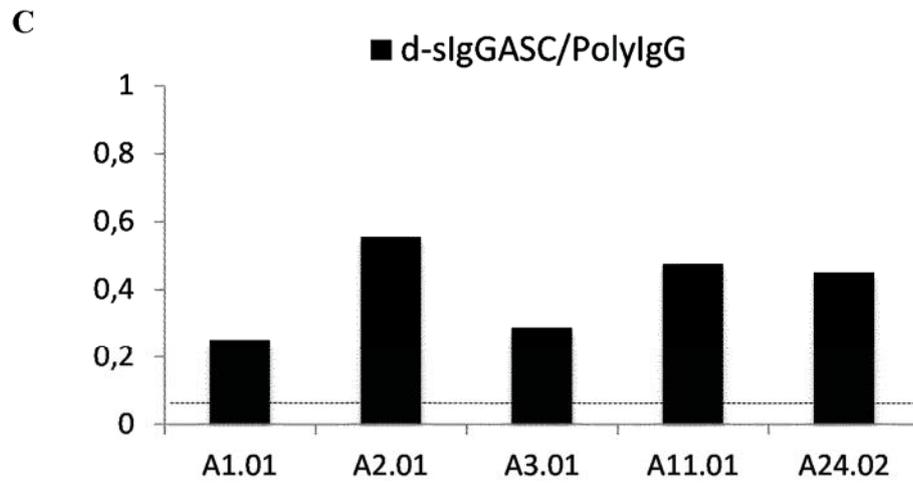


FIG. 6 (CONT.)

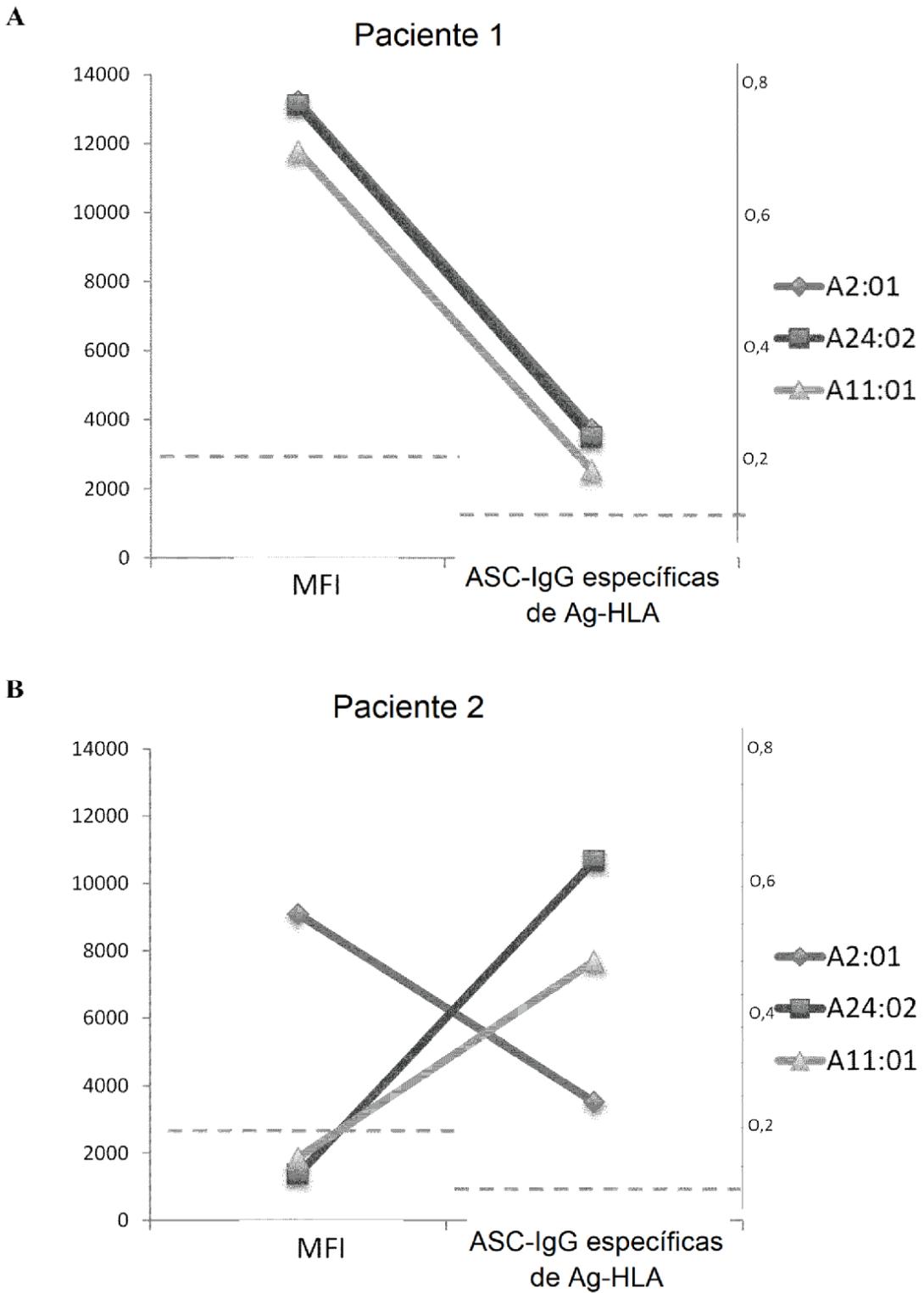
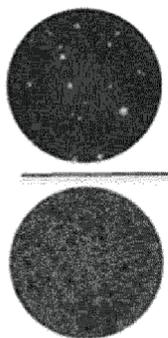


FIG. 7

A

$$\text{Frecuencia de ASC-IgG específicas de HLA} = \frac{\text{Número de manchas específicas de HLA}}{\text{Número de manchas de IgG policlonales totales}}$$


B

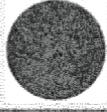
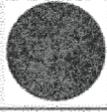
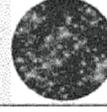
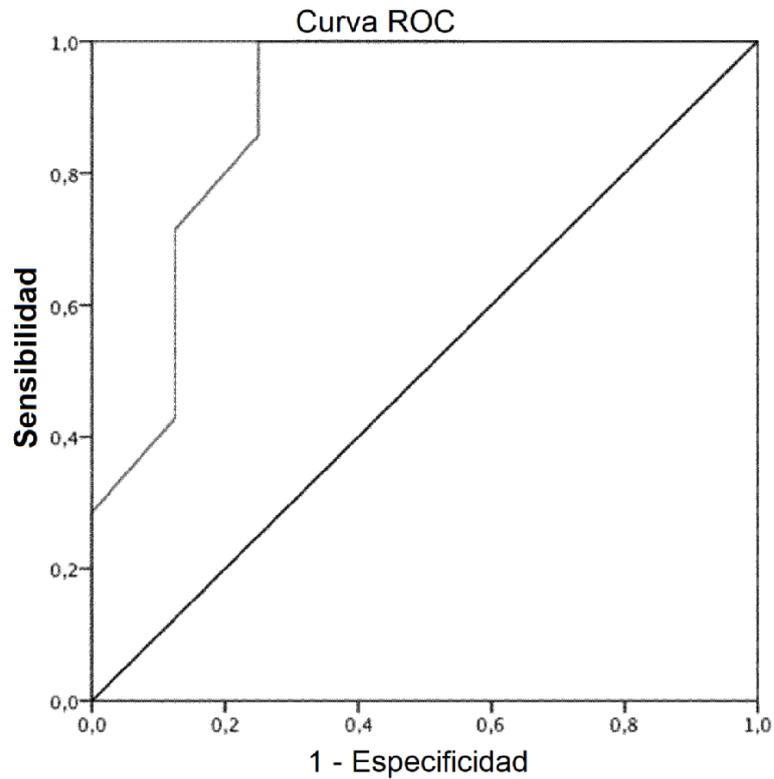
	Antígeno HLA	Manchas de IgG totales	Manchas de HLA	Relación HLAsp/IgGpoli	MFI		
P N.º 1	A11:01	124		33		0,265	12565
	A2:01	124		47		0,382	15169
	A24	124		42		0,337	14784
P N.º 2	A11:01	209		92		0,440	1858
	A2:01	209		37		0,179	9080
	A24	209		120		0,574	2359

FIG. 8



Los segmentos diagonales se producen mediante enlaces.

Área	Error estándar ^a	Señal asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótica del 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
.893	.088	.011	.721	1.000

Coordenadas de la curva

Variable(s) del resultado de la prueba: relación ds_BCE

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
.0000	1,000	1,000
.0550	1,000	,875
.0950	1,000	,750
.1250	1,000	,625
.1600	1,000	,500
.2200	1,000	,375
.2850	1,000	,250
.3500	,857	,250
.4250	,714	,125
.4850	,571	,125
.5850	,429	,125
.6750	,286	,000
.8300	,143	,000
1,0000	,000	,000

FIG. 9

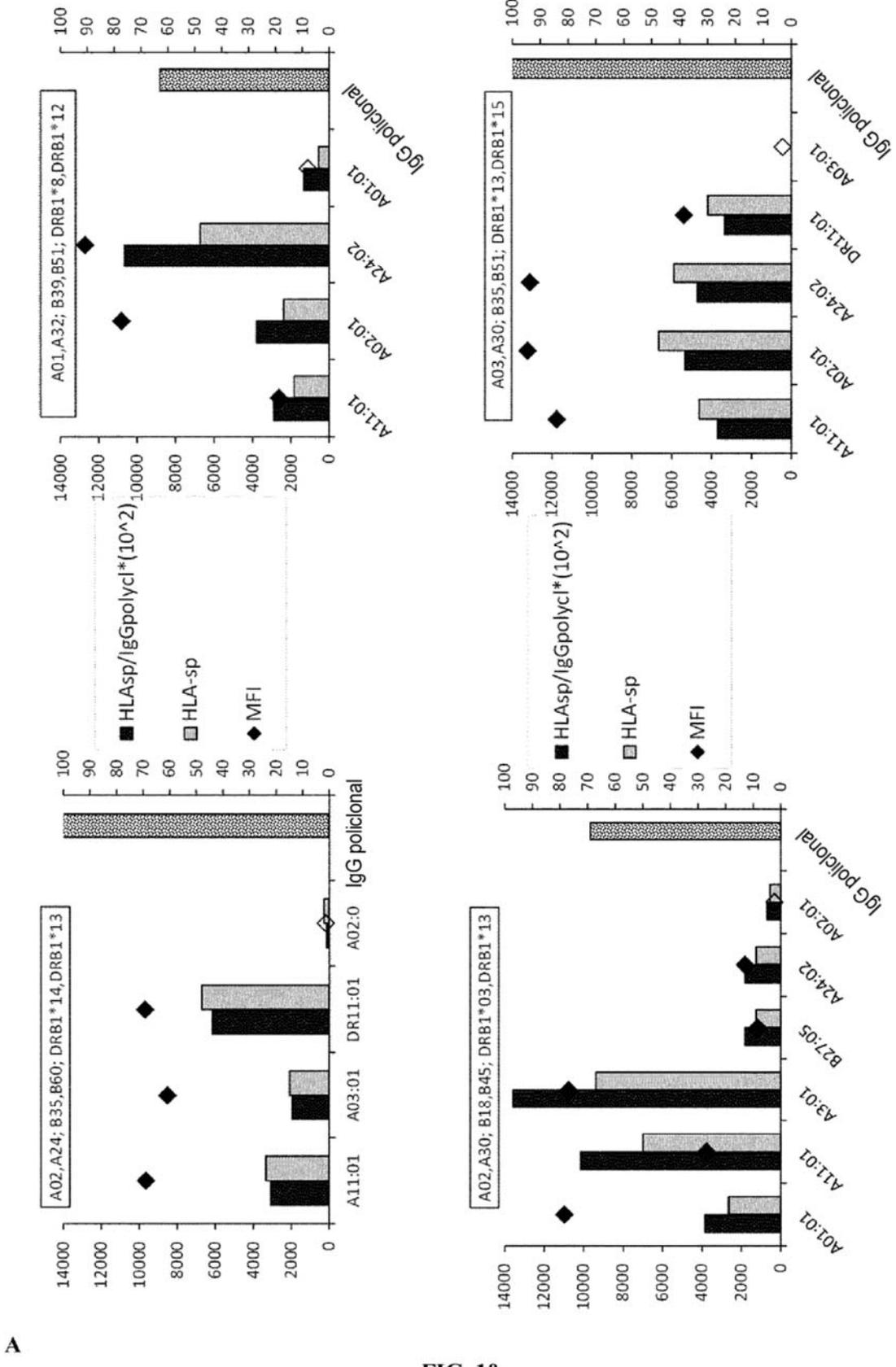


FIG. 10

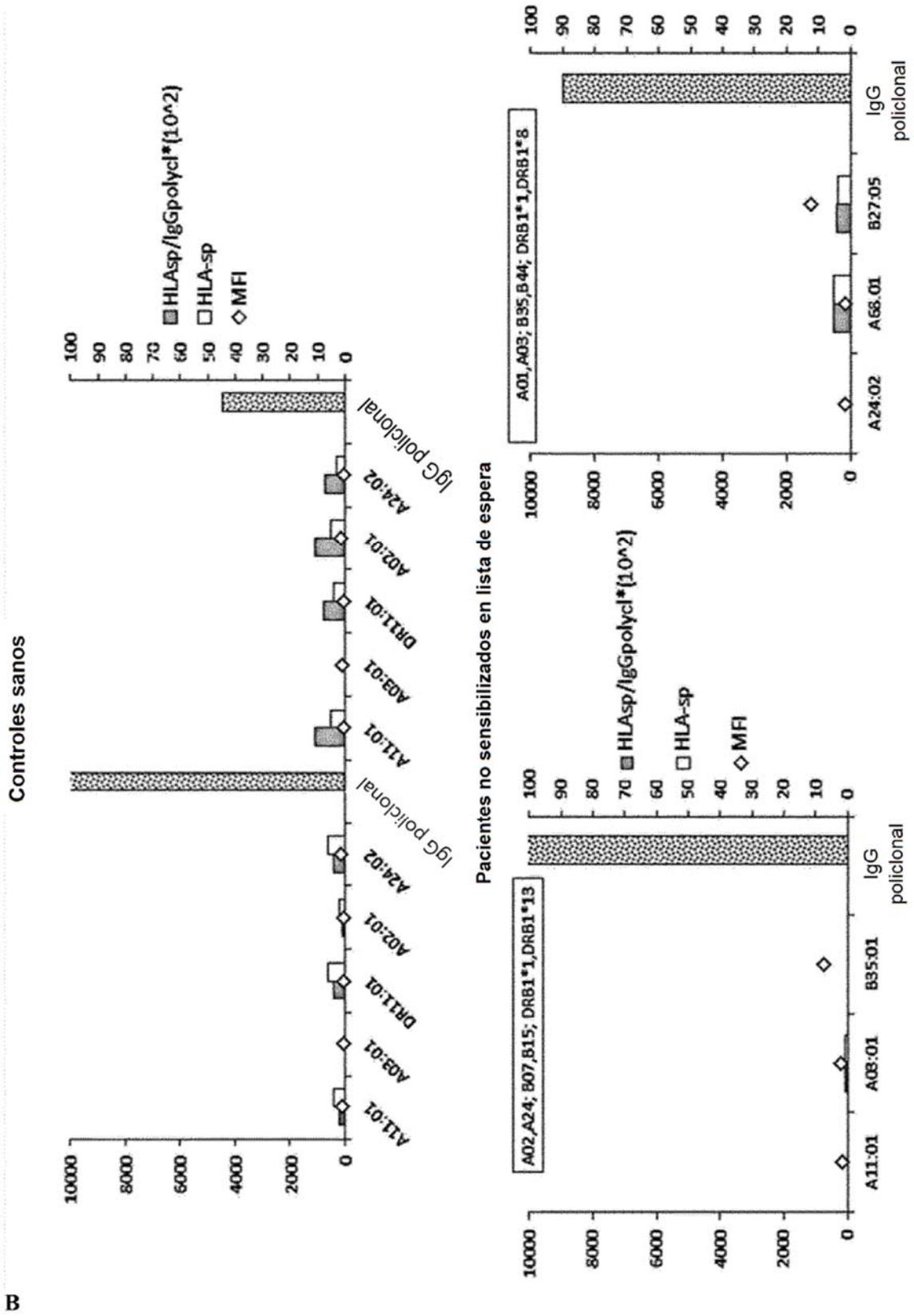


FIG. 10 (Cont.)

A

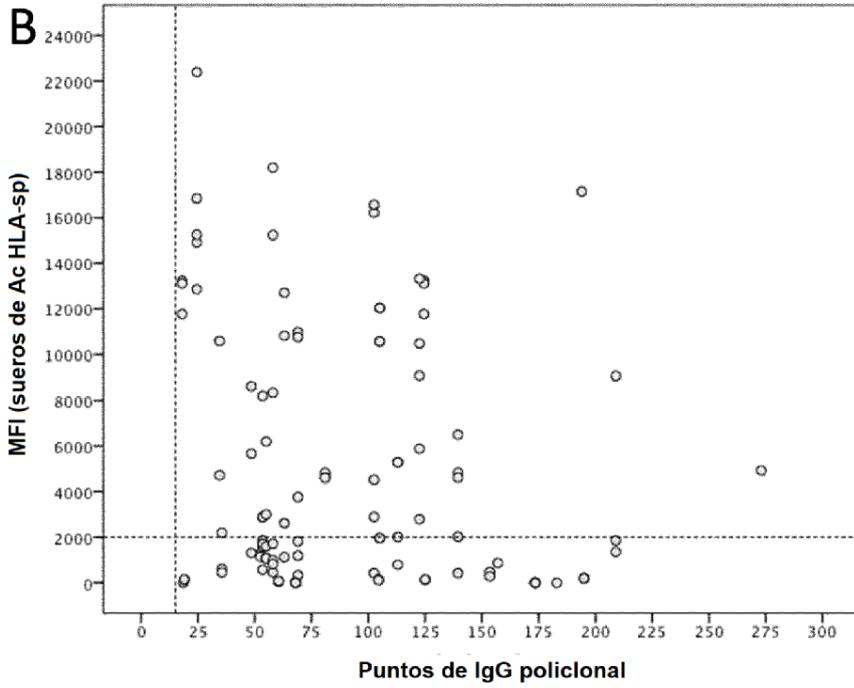
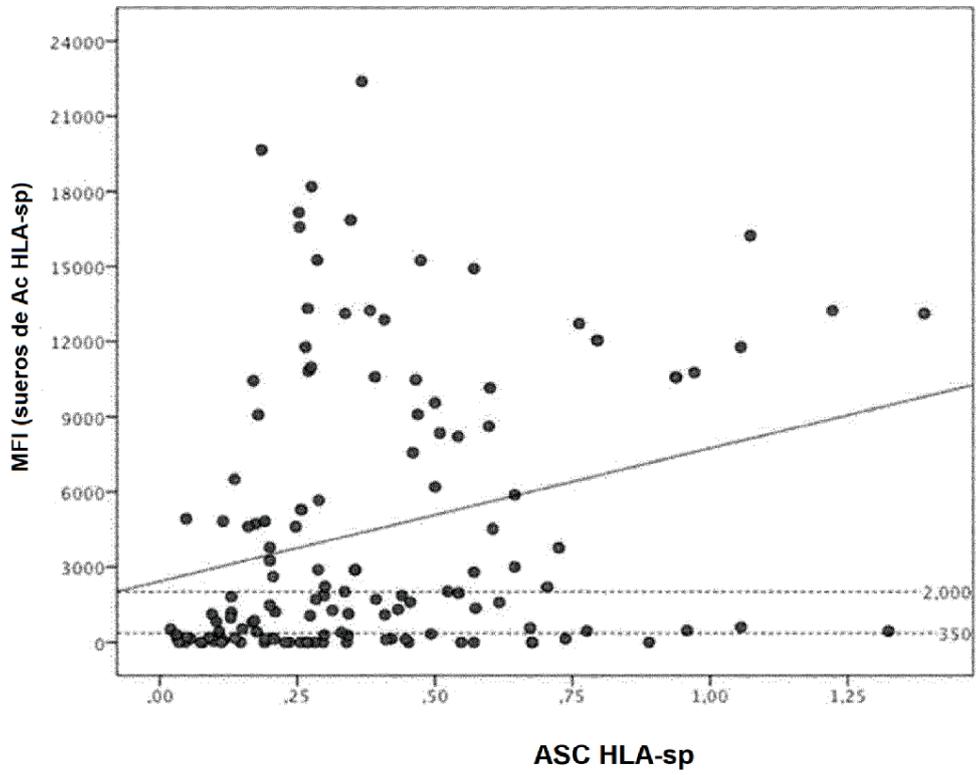


FIG. 11

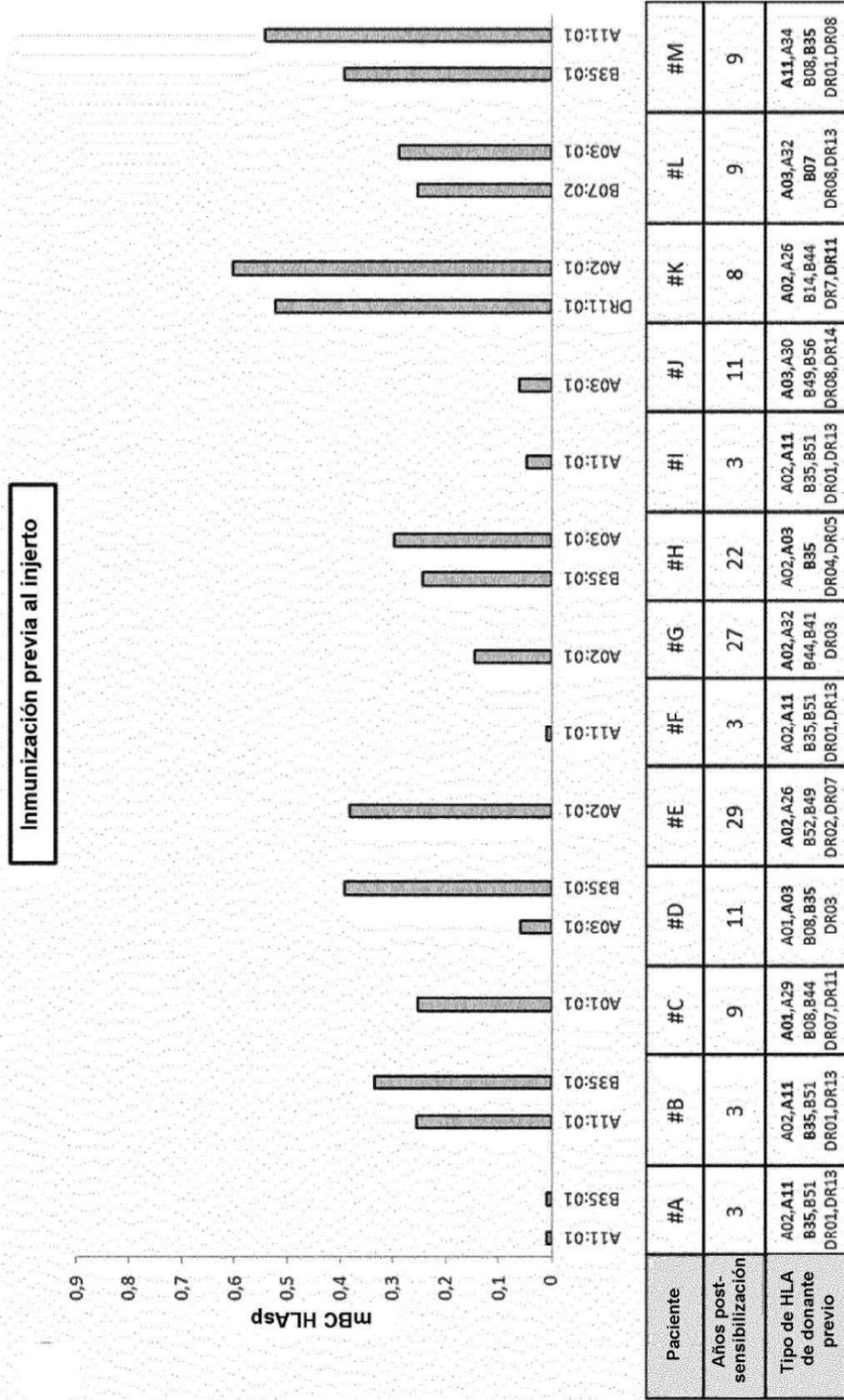


FIG. 12

A

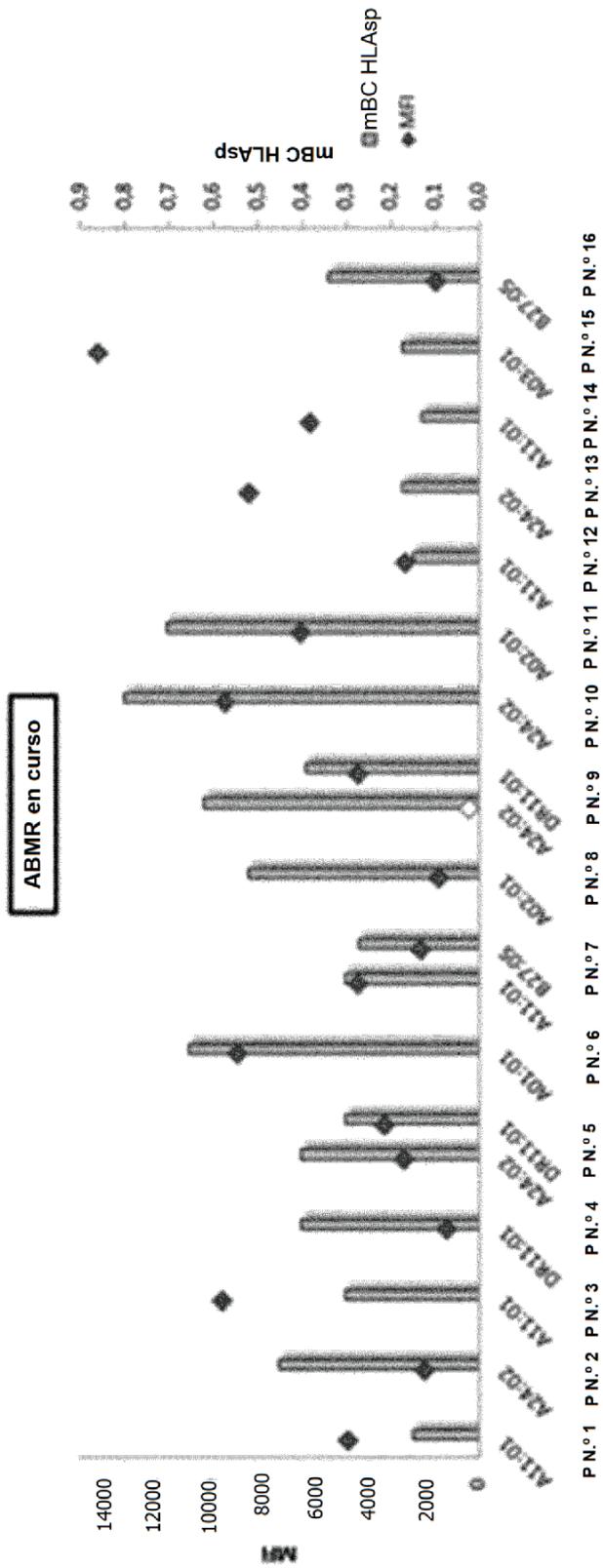


FIG. 13

B

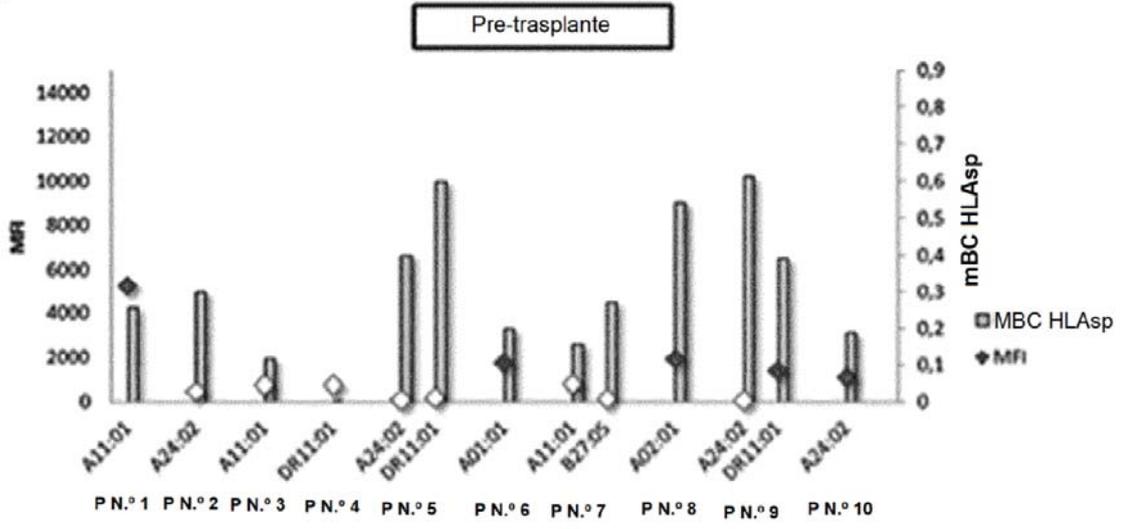


FIG. 13 (cont.)

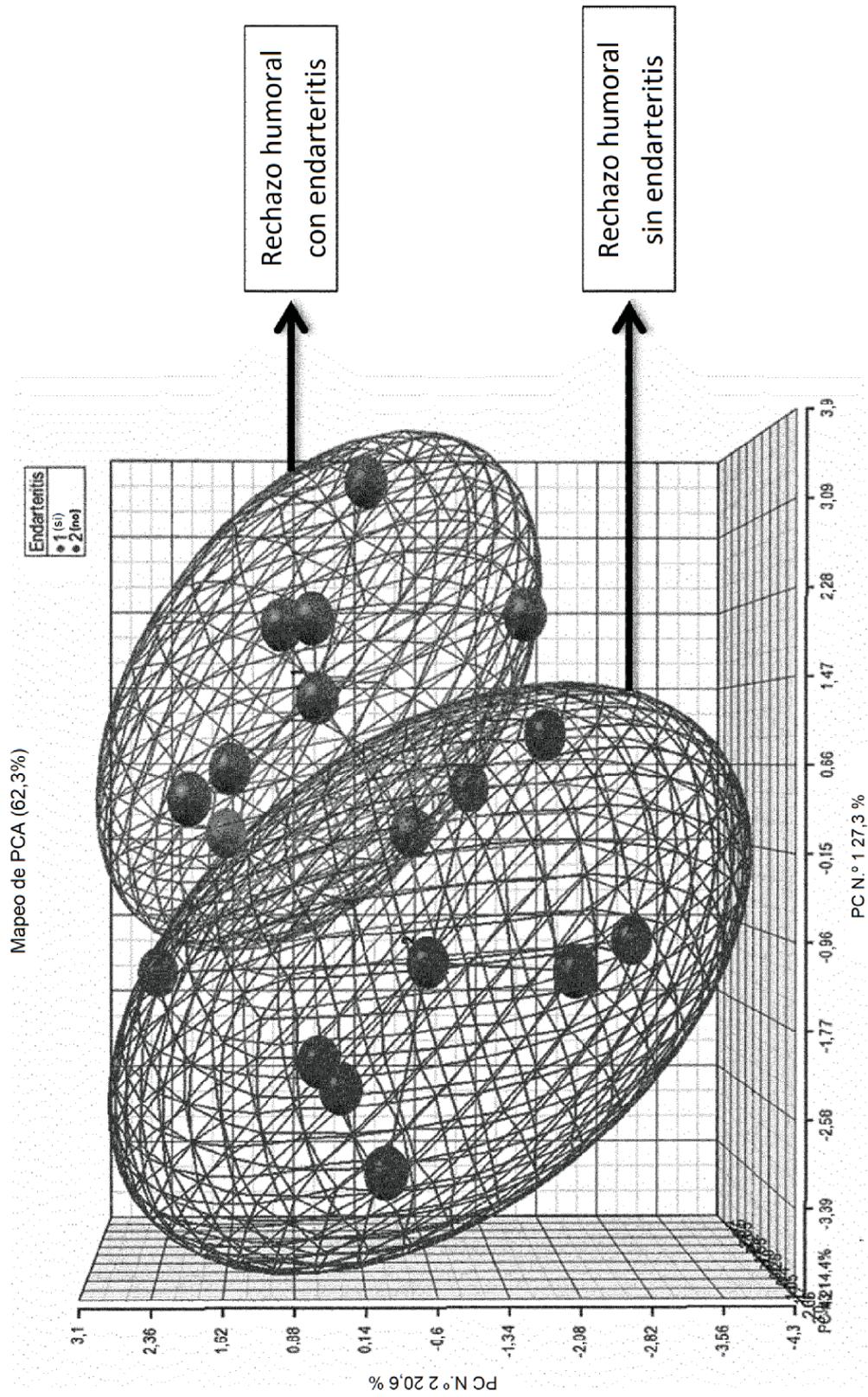


FIG. 14

Frecuencia de ASC-IgG específicas de HLA

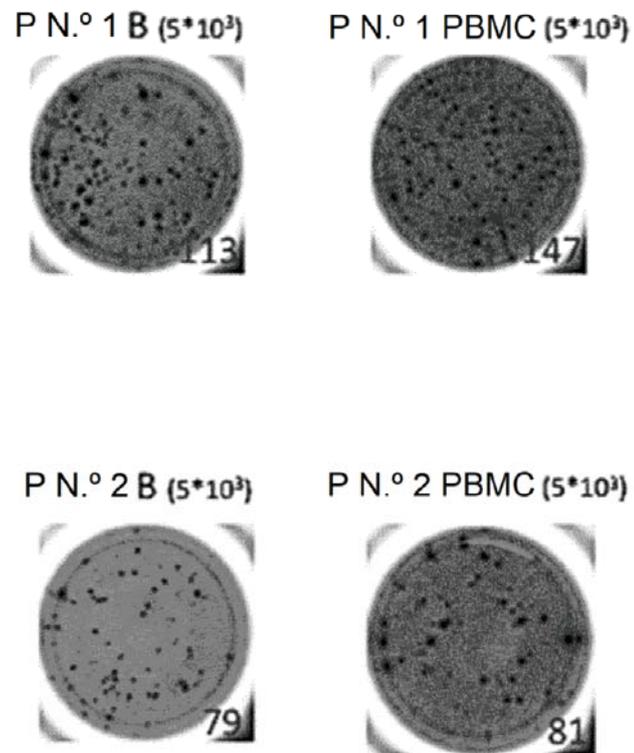


FIG. 15

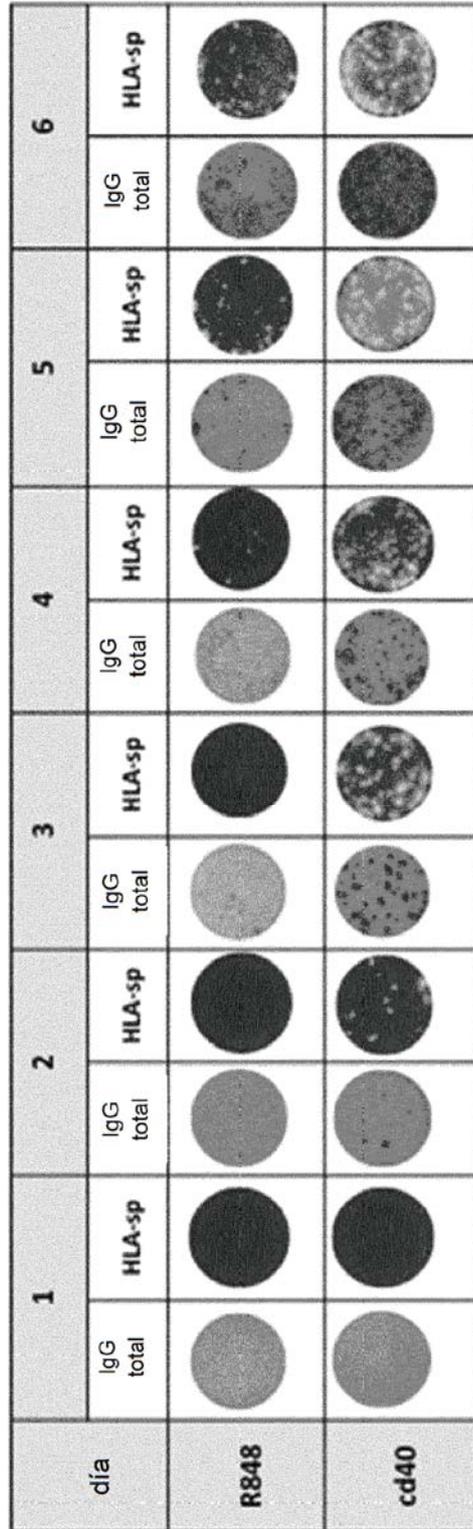


FIG. 16