(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 791 981**

(51) Int. CI.:

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/80 (2006.01)
C07K 16/34 (2006.01)
B01D 15/38 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2016 PCT/EP2016/053989**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016 WO16135246**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2016 E 16706602 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3262422**

(54) Título: **Método y sistema de detección de anticuerpos**

(30) Prioridad:

25.02.2015 EP 15156590

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2020

(73) Titular/es:

DRK-BLUTSPENDEDIENST BADEN-WÜRTTEMBERG-HESSEN GGMBH (50.0%)
Sandhofstrasse 1
60528 Frankfurt am Main, DE y
JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT FRANKFURT AM MAIN (50.0%)

(72) Inventor/es:

BÖNIG, HALVARD;
GEISEN, CHRISTOF;
WIERCINSKA, ELIZA JUSTYNA y
RYSCHKA, NIKOLAS

(74) Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

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 y sistema de detección de anticuerpos

Campo de la invención

La presente invención proporciona un sistema celular para la detección de la presencia de una o más especies de anticuerpos humanos en la muestra, preferentemente una muestra de suero o plasma. El método es particularmente útil para el análisis de pacientes que han sido sensibilizados contra los antígenos de los grupos sanguíneos expresados en eritrocitos, plaquetas o granulocitos. El sistema usa células no humanas marcadas con fluorescencia específicas para cada antígeno y, por lo tanto, para cada especie de anticuerpo. Se proporcionan los métodos, sistemas y kits de diagnóstico para realizar los métodos de la invención. Además, la presente invención describe un método para eliminar anticuerpos de una muestra tal como una muestra de suero. Tal método es útil para absorber anticuerpos de sueros poliaglutinantes.

Descripción

Secundario a la sensibilización (transfusión, embarazo, etc.), pueden inducirse anticuerpos contra antígenos de los grupos sanguíneos en los eritrocitos (RBC), plaquetas y granulocitos. Como estos pueden desencadenar reacciones adversas en caso de re-desafío, se usan pruebas de diagnóstico sensibles para su detección.

Los productos sanguíneos negativos para antígenos se usan para transfusiones. La detección de estos anticuerpos depende clásicamente del uso de paneles celulares, cada uno de los cuales expresa el rango completo de especificidades de antígeno, aunque en combinación aleatoria. De este modo, los análisis de la fuerza de reacción con ciertas células del panel, pero no con otras se interpretan como reactividad contra ciertos antígenos (aquellos que estas células del panel individuales comparten o tienen en común). Inversamente, la ausencia de reactividad con células que portan homocigóticamente un cierto antígeno se interpreta como no reactividad con este antígeno. En la actualidad, existen más de 400 antígenos de los grupos sanguíneos en RBC conocidos en 30 sistemas de grupos sanguíneos y aproximadamente una docena de antígenos de los grupos sanguíneos de granulocitos y plaquetas. Al ser una célula natural (RBC, plaqueta o granulocito de un donante), cada célula del panel obviamente porta una gran cantidad de antígenos, típicamente al menos un antígeno de cada grupo de antígenos o sistema de grupos sanguíneos. Para los RBC, las pruebas para detectar posibles antígenos anti-RBC se realizan antes de cada transfusión, de las cuales hay más de 4 millones por año solo en Alemania. Para los granulocitos y las plaquetas, cuya transfusión ya es significativamente menos frecuente, debido a la falta de pruebas sólidas, rápidas y asequibles, el diagnóstico de anticuerpos se inicia solo para pacientes con reacciones adversas o refractariedad a la transfusión.

En el caso de los RBC, hay disponibles muchas pruebas de rutina simples y altamente efectivas, la mayoría de las cuales dependen de la reactividad del panel como se describió anteriormente. En algunas situaciones, estas pruebas fallan: cuando los anticuerpos panaglutinantes están presentes, no hay células de panel negativas que puedan usarse para descartar la tolerancia a ciertos antígenos. En pacientes con anticuerpos autorreactivos, con una mezcla de anticuerpos contra varios antígenos o con anticuerpos contra antígenos de alta frecuencia, las pruebas tampoco permiten la identificación de antígenos tolerables. Por lo tanto, la diferenciación de anticuerpos se verá obstaculizada o (las combinaciones de) anticuerpos específicos se interpretarán falsamente como panaglutinación, que típicamente es clínicamente irrelevante. Los paneles típicamente no identifican los antígenos contra antígenos raros, porque ninguna de las células del panel los expresará; por lo tanto, pueden perderse anticuerpos potencialmente graves. Por lo tanto, los diagnósticos estándar están disponibles y la mayoría de las veces rinden, pero en situaciones específicas fallan. Existen algunas pruebas alternativas, donde los antígenos de los grupos sanguíneos están inmovilizados en partículas de látex fluorescentes, pero estas no son adecuadas para los antígenos de RBC típicos que son proteínas de membrana de estructura proteica muy compleja. Por el contrario, pruebas similares con plaquetas y granulocitos están menos estandarizadas y significativamente complicadas por la corta vida útil de los paneles de prueba de plaquetas o granulocitos.

El documento US2007/161056 A1 describe métodos para detectar anticuerpos en una muestra, donde el anticuerpo se dirige a un antígeno expresado por glóbulos rojos o fantasmas de glóbulos rojos. Específicamente, el método implica generar glóbulos rojos o fantasmas de glóbulos rojos codificados con fluorescencia con presentación de antígeno conocida y usarlos para detectar la presencia de anticuerpos en suero/plasma con un inmunoensayo fluorescente tipo sándwich.

En vista de los problemas mencionados anteriormente asociados con los sistemas de detección de anticuerpos contra antígenos de los grupos sanguíneos de última generación, la presente invención busca proporcionar una metodología más simple y mejorada para determinar grupos sanguíneos en una muestra de un sujeto.

Además, la presente invención busca resolver los problemas asociados con los sueros poliaglutinantes que contienen anticuerpos contra una multitud de antígenos de los grupos sanguíneos. Tales sueros pueden conducir a diagnósticos convencionales después de la eliminación selectiva de una o más especies de anticuerpos humanos. Por lo tanto, otro problema que la invención busca resolver es simplificar la eliminación o la reducción de los anticuerpos contra antígenos de los grupos sanguíneos de una muestra de suero.

El primer problema anterior se resuelve en un primer aspecto mediante un método para la detección de una o más especies de anticuerpos humanos en una muestra, el método comprende

a. Poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene la una o más especies de anticuerpos humanos con una o más especies celulares de sondeo no humanas y un agente de unión a anticuerpos,

i. en donde el agente de unión a anticuerpos está acoplado a un primer marcador detectable y puede unirse a anticuerpos humanos, y

ii. en donde una célula de sondeo de la especie celular de prueba no humana expresa, o puede expresar, un segundo marcador detectable y una proteína antigénica, la proteína antigénica comprende una porción antigénica que puede unirse o puede estar unida por, un anticuerpo de la una o más especies de anticuerpos humanos a detectar; y

b. Detectar la presencia de una señal del primer marcador detectable y el segundo marcador detectable para cada célula de sondeo, en donde la presencia de una señal del primer marcador detectable y la presencia de una señal del segundo marcador detectable indica la presencia de una o más especies de anticuerpos humanos en la muestra.

El primer problema anterior se resuelve en un aspecto alternativo mediante un método para la detección de una o más especies de anticuerpos humanos en una muestra, el método comprende

a. Poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene la una o más especies de anticuerpos humanos con una o más especies celulares de sondeo no humanas y un agente de unión a anticuerpos,

i. en donde el agente de unión a anticuerpos está acoplado a un primer marcador detectable y puede unirse a anticuerpos humanos, y

ii. en donde una célula de sondeo de una especie celular de sondeo no humana se inmoviliza en una ubicación predeterminada en un sustrato sólido, y en donde la célula de sondeo expresa, o puede expresar, una proteína antigénica, la proteína antigénica comprende una porción antigénica que puede unirse, o puede estar unida por, un anticuerpo de la una o más especies de anticuerpos humanos a detectar; y

b. Detectar la presencia de una señal del primer marcador detectable para cada célula de sondeo inmovilizada en el sustrato sólido, en donde la presencia de una señal del primer marcador detectable en una ubicación predeterminada en el sustrato sólido indica la presencia de la una o más especies de anticuerpos humanos en la muestra.

En este aspecto, pueden inmovilizarse múltiples especies celulares de sondeo no humanas en un sustrato sólido en ubicaciones predeterminadas que incluyen controles positivos y negativos. La detección de la presencia de la una o más especies de anticuerpos humanos en la muestra se logra escaneando el sustrato para la señal del primer marcador detectable. Solo la presencia de la señal en las ubicaciones predeterminadas donde se inmovilizó una célula de sondeo que expresa la proteína antigénica respectiva es indicativa de la presencia de una o más especies de anticuerpos humanos en la muestra.

El sustrato o chip sólido en este aspecto puede ser un portaobjetos de vidrio o plástico, o cualquier otro portador adecuado que permita la inmovilización de especies celulares de sondeo no humanas. La detección de una o más especies de anticuerpos humanos en la muestra (por ejemplo, para la detección de anticuerpos específicos a antígenos de los grupos sanguíneos) se logra mediante el uso del agente de unión a anticuerpos como se describió anteriormente. Los marcadores adecuados para el agente de unión a anticuerpos se describirán en la presente descripción más adelante. La identificación de la presencia o ausencia de la especie de anticuerpos humanos a detectar en esta modalidad se basa en la ubicación física predeterminada de la especie celular de sondeo no humana en el sustrato sólido (Chip) exactamente de la misma manera que si la identificación fuera por detección del marcador fluorescente de la célula y el segundo marcador en el anticuerpo anti-Ig humana que debe coincidir para declarar una especificidad de anticuerpo.

Los inventores aquí proponen un nuevo método para la detección de antígenos de los grupos sanguíneos en RBC, plaquetas y granulocitos que se basa en la expresión de un solo antígeno por célula (célula xenogénica, cualquier especie) y la coexpresión de uno o varios marcadores detectables. Se prepara una mezcla de células que contiene células con expresión superficial de diferentes antígenos (todos los antígenos de interés), cada uno identificado por un fluorocromo diferente. La mezcla de células se incuba con suero o plasma del paciente. El anticuerpo contra una de las células es reconocido mediante la incubación de las células con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con un fluorocromo discriminante no contenido en la mezcla de células (por ejemplo, APC). La mezcla de células se analiza después por citometría de flujo. La población de células positivas para APC (es decir, decoradas con anticuerpos) se analiza para determinar su fluorescencia endógena, por ejemplo, RFP. Esto indica que el suero del paciente contenía anticuerpos contra el único antígeno de los grupos sanguíneos expresado por la célula RFP+. Se generarán mezclas de células que contienen células que juntas expresan grupos de ciertos antígenos, tales como antígenos comunes, antígenos raros, antígenos de alta frecuencia, etc. para complementar el arsenal actual de diagnóstico de anticuerpos contra RBC. De manera similar, las células que expresan un antígeno común que dificulta el diagnóstico con la tecnología estándar, pueden reducirse en los sueros. Por lo tanto, el suero del paciente que contiene, por ejemplo, anticuerpos contra el antígeno "e" del sistema del grupo sanguíneo Rh, una pseudoespecificidad muy frecuente de anticuerpos autorreactivos, clínicamente irrelevantes pero que dificultan el diagnóstico, se incuba con células que expresan, en este caso, el antígeno de los grupos sanguíneos "e". Las células atraparán el anticuerpo, se sedimentarán por centrifugación. Por lo tanto, el suero reducido en anti "e" puede someterse a diagnósticos de rutina (detección de anticuerpos específicos adicionales mediante el uso de pruebas de diagnóstico estándar o novedosas). La misma tecnología se aplicará para expresar antígenos de plaquetas o granulocitos en las células, como se describió anteriormente, para detectar con un anticuerpo

secundario anti-IgG conjugado con fluorocromo, anticuerpos contra HPA o HNA en suero de pacientes. Aunque se requiere con menos frecuencia como una prueba de diagnóstico, se espera que la simplicidad mucho mayor de esta prueba en comparación con la tecnología disponible actualmente permita que esta prueba se convierta en el diagnóstico de rutina para el anticuerpo anti-plaquetas y anti-granulocitos.

Al poner en contacto las especies celulares de sondeo no humanas y el agente de unión al antígeno con la muestra que se sospecha que comprende uno o más anticuerpos de las especies de anticuerpos humanos a detectar, en el caso de que un anticuerpo tal esté presente, se forma un complejo de las especies celulares de sondeo, el anticuerpo a detectar y el agente de unión del anticuerpo. El complejo se forma mediante la interacción específica de la proteína antigénica en la célula de sondeo y el anticuerpo complementario a detectar, así como también la unión del agente de unión del anticuerpo al anticuerpo a detectar. Por lo tanto, al observar la presencia del primer y segundo (o más) marcadores detectables para una célula de sondeo no humana, la presencia de ambas señales es indicativa de la presencia del complejo formado. En el caso de que el anticuerpo humano candidato a detectar no esté presente, el complejo no se forma y ninguna especie celular de sondeo tiene el primer y el segundo marcador detectable.

El término "agente de unión a anticuerpos" en el contexto de la invención se referirá a cualquier molécula que tenga la capacidad de unirse a anticuerpos. En particular, se prefieren las proteínas de inmunoglobulina tales como anticuerpos o constructos de TCR. Lo más preferido para la materia descrita en la presente descripción es que el agente de unión a anticuerpos sea un anticuerpo específico para el tipo de organismo (especie) del anticuerpo candidato.

Una "muestra" en el contexto de la presente invención es, preferentemente, una muestra biológica. El término "muestra biológica" en el contexto de la invención descrita en la presente descripción se refiere preferentemente a una muestra líquida tal como una muestra de sangre, muestra de suero o muestra de plasma. Como se usa más adelante, el término "muestra de sangre" es una muestra biológica que se deriva de sangre, preferentemente sangre periférica (o circulante). Una muestra de sangre puede ser, por ejemplo, sangre total, plasma o suero.

En una modalidad preferida los métodos de la invención descrita en la presente descripción se realizan en un método *in vitro* o *ex vivo.*

En algunas modalidades de la invención se prefiere que la etapa de adquirir la muestra a analizar de un sujeto, tal como un paciente, se excluya de los métodos descritos.

La proteína antigénica es preferentemente un antígeno de superficie celular y puede comprender preferentemente un dominio transmembrana o un anclaje transmembrana. El término "antígeno de superficie celular" se refiere a una molécula biológica que se expresa y se dirige a la superficie celular, es decir, la membrana celular. Aunque se prefiere el uso del antígeno de superficie celular para realizar los métodos de la presente invención, también puede usarse cualquier otro antígeno que se exprese para ser localizado exclusivamente en o sobre la especie celular de sondeo. Para permitir una unión entre la proteína antigénica con la especie de anticuerpo candidato de la invención, una célula de sondeo no humana también puede fijarse y permeabilizarse para permitir que una especie de anticuerpos humanos candidatos entre en la célula de sondeo. Por lo tanto, lo más preferido es que la proteína antigénica no sea una proteína secretada.

La una o más especies de anticuerpos a detectar con los métodos de la invención es un anticuerpo humano, y en donde el agente de unión a anticuerpos es un anticuerpo anti-humano. El término "anticuerpo", como se usa en la presente descripción, incluye anticuerpos de una fuente monoclonal o policlonal que se produce en respuesta a un antígeno, así como también fragmentos, formas quiméricas, formas alteradas y derivados de tal anticuerpo, así como también formas producidas por vía química o recombinante de los mismos. El término "anticuerpo anti-humano" como se usa en la presente descripción se refiere a un anticuerpo que reconoce y se une a la inmunoglobulina humana.

En algunas modalidades, la especie celular de sondeo es una célula que no expresa endógenamente la proteína antigénica ni ninguna otra proteína que pueda estar unida por la una o más especies de anticuerpos humanos a detectar, preferentemente, en donde la especie celular de sondeo no es una célula humana, tal como una célula de ratón, o alternativamente una célula que no es de mamífero, con la máxima preferencia una célula de invertebrado, tal como una célula de insecto. Aunque el método también funciona en un escenario isogénico tal como la detección de una especie de anticuerpos humanos mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción que comprenden una célula humana como una especie celular de sondeo, sin embargo, es una modalidad preferida usar una célula que no puede expresar la proteína antigénica, ni una proteína que está estrechamente relacionada con la proteína antigénica usada en los métodos de la presente invención. Es ventajoso para los métodos de la invención reducir la posibilidad de unión inespecífica de la especie de anticuerpo candidato con otros componentes expresados en o sobre las especies celulares de sondeo. El enfoque más fácil usado en el contexto de la invención es seleccionar una especie celular de sondeo que se derive de un organismo diferente que la especie de anticuerpo a detectar. Por ejemplo, si la especie de anticuerpo a detectar es un anticuerpo humano, sería preferible usar una especie celular de sondeo derivada de una línea celular no humana, tal como una célula de ratón o rata.

Para proporcionar las especies celulares de sondeo de la invención, una proteína antigénica como se describió anteriormente y un marcador detectable tienen que expresarse en la misma. Esto se logra, preferentemente, mediante la expresión recombinante de la proteína antigénica y/o el marcador detectable. Por lo tanto, se prefiere que, en el contexto

de la invención, las especies celulares de sondeo no humanas comprendan un primer constructo genético que codifique la proteína antigénica, y un segundo constructo genético que codifique el segundo marcador detectable, o en donde la proteína antigénica y el segundo marcador detectable estén codificados en un constructo genético.

Como se usa en la presente descripción, el término "constructo genético" se refiere a las moléculas de ADN o ARN que comprenden una secuencia de nucleótidos, que codifica una proteína antigénica o un marcador detectable. La secuencia de codificación incluye señales de iniciación y terminación operativamente unidas a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación capaz de dirigir la expresión en las especies celulares de sondeo usadas para la realización del método de la invención.

Como se usa en la presente descripción, el término "forma expresable" se refiere a constructos génicos que contienen los elementos reguladores necesarios unidos operativamente a una secuencia codificante que codifica un marcador detectable o proteína antigénica, de modo que cuando esté presente en la especie celular, la secuencia codificante se expresará.

Un "marcador detectable" en el contexto de la presente invención es un marcador detectable que puede producir una señal que es detectable por medios visuales o instrumentales, por ejemplo, una proteína fluorescente, una proteína con la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de restos biotinilo que pueden detectarse mediante avidina o estreptavidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, 3H 14C, 35S, 90Y, 99Tc, 111In, 125I, 131I, 177Lu, 166Ho o 153Sm), cromógenos, marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotinilo, epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un reportero secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopo) y agentes magnéticos (por ejemplo, quelatos de gadolinio). Los ejemplos representativos de marcadores comúnmente empleados para inmunoensayos incluyen restos que producen luz, por ejemplo, compuestos de acridinio, y restos que producen fluorescencia, por ejemplo, fluoresceína. Un marcador detectable de la invención puede expresarse directamente o acoplarse alternativamente a un componente que se pretende obtener marcado de forma detectable, por ejemplo, el agente de unión a anticuerpos de la invención.

Preferentemente, dicho primer marcador detectable y segundo marcador detectable producen señales que son distinguibles, tales como proteínas fluorescentes que producen señales de luz con diferentes longitudes de onda.

Un marcador fluorescente se refiere a una proteína que cuando se excita con la longitud de onda necesaria puede fluorescer o producir luz. Para el propósito de la presente invención, una proteína fluorescente es una proteína que cuando se excita con una longitud de onda apropiada da como resultado la emisión de una señal de luz que puede detectarse. En una modalidad preferida, el espectro de emisión de la proteína fluorescente de acuerdo con la invención está entre 445-660 nm, entre 550-660 nm y la máxima preferencia entre 550-660 nm.

Las proteínas fluorescentes cuando se usan como marcadores en el contexto de la invención pueden seleccionarse de a. proteína fluorescente verde seleccionada del grupo de EGFG, AcGFP, TurboGFP, Emerald, Azani Green y ZsGreen, b. proteína fluorescente azul seleccionada del grupo de EBFP, Sapphire y T-Sapphire, c. proteína fluorescente cian seleccionada del grupo de ECFP, mCFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midori-Ishi Cyan y mTFPI (Teal), d. proteína fluorescente amarilla seleccionada del grupo de EY-FP, Topaz, Venus, mCitrine, Ypet, PhiYFP, ZsYellow1 y mBanana, e. proteínas fluorescentes anaranjadas y rojas seleccionadas de Kusabira Orange, mOrange, dTomato, dTomato-Tandem, DsRed, DsRed2, DsRed-Express (T1), DSRed-Monomer, mTangerine, mStrawberry, AsRed2, mRFP1, Jred, mCherry, HcRed1, mRaspberry, HcRed-Tandem, mPlum y AQ143. Las secuencias y los métodos para su detección de los marcadores fluorescentes mencionados anteriormente son bien conocidos por el experto en la técnica.

En algunas modalidades de la invención, la presencia de una señal del primer marcador detectable y el segundo marcador detectable para cada célula de sondeo se realiza por citometría o microscopía. Como se describió anteriormente, la presente descripción proporciona métodos citométricos para la detección de células de sondeo. El término "métodos citométricos" se usa en la presente descripción para describir métodos citométricos de flujo y/o métodos citométricos de imagenología. En consecuencia, "ensayo citométrico" puede referirse a un ensayo citométrico de flujo y/o ensayo citométrico de imagenología, y "citómetro" puede referirse a un citómetro de flujo y/o citómetro de imagenología.

Alternativamente, la presencia del primer y el segundo marcador detectable puede analizarse mediante el uso de un microscopio fluorescente.

Aunque el método es en principio aplicable para la detección de cualquier anticuerpo en una muestra, en ciertas modalidades preferidas la especie de anticuerpo humano de la invención es una especie de anticuerpos humanos específicos para un antígeno de los grupos sanguíneos, y en donde la proteína antigénica es el antígeno de los grupos sanguíneos correspondiente. El término "antígeno de los grupos sanguíneos" significa cualquier antígeno del sistema ABO con el antígeno A, el antígeno B, los antígenos A y B expresados simultáneamente o el antígeno H, del sistema Rh con los antígenos D, E, e, Cw, y C o c, del sistema Kell con el antígeno K o k, del sistema Duffy (Fya, Fyb), del sistema

Kidd (Jka, Jkb) o de otros sistemas que se investigan con menos frecuencia en la práctica pero que también existen, tales como MNS, Lewis, etc. Además, se incluyen bajo este término los antígenos plaquetarios (HPA) y los antígenos de neutrófilos (HNA)

En esta modalidad el método de la invención puede usarse para la detección de un antígeno de los grupos sanguíneos en una muestra obtenida de un sujeto, en donde dicha muestra obtenida de un sujeto es la muestra biológica.

El método de la invención descrito anteriormente comprende la detección de una especie de anticuerpos humanos en la muestra. Sin embargo, lo más preferido es usar el método en la detección de una pluralidad de especies de anticuerpos candidatos distintos que podrían estar presentes en la muestra. En este aspecto para cada una de las especies de anticuerpos humanos a detectar, se proporciona una especie celular de sondeo no humana correspondiente con la proteína antigénica correspondiente (que puede unirse a la especie de anticuerpo candidato) y se proporciona un marcador detectable distinto. Durante la etapa (a) del método descrito, la muestra se pone en contacto con todas las especies celulares de sondeo no humanas y el agente de unión a anticuerpos. Los complejos de diferentes anticuerpos humanos y especies celulares de sondeo no humanas - si se forman dependiendo de la presencia o ausencia de la pluralidad de especies de anticuerpos humanos candidatos a detectar - pueden distinguirse de otra en función de los segundos marcadores detectables usados en las especies celulares de sondeo no humanas. Dependiendo de la combinación del primer y segundo marcador detectable observado para una célula de sondeo no humana, puede deducirse la presencia o ausencia de la especie de anticuerpos humanos. Por lo tanto, para esta modalidad es perjudicial que el primer y el segundo o más marcadores detectables sean distinguibles entre sí.

Una modalidad ilustrativa se refiere a un método para la detección de cualquiera de al menos dos o más especies de anticuerpos humanos en una muestra, el método comprende:

a. Poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene cualquiera de las dos o más especies de anticuerpos humanos, con dos o más especies celulares de sondeo no humanas y un agente de unión a anticuerpos,

i. en donde el agente de unión a anticuerpos está acoplado a un primer marcador detectable y puede unirse a anticuerpos humanos, y

ii. en donde una primera especie celular de sondeo no humana expresa, o puede expresar, un segundo marcador detectable y una primera proteína antigénica, la primera proteína antigénica que comprende una porción antigénica que puede unirse, o puede estar unida por, una primera especie de anticuerpos humanos a detectar; y

iii. en donde una segunda especie celular de sondeo expresa, o puede expresar, un tercer marcador detectable y una segunda proteína antigénica, la segunda proteína antigénica que comprende una porción antigénica que puede unirse, o puede estar unida por, una segunda especie de anticuerpos humanos a detectar; y

b. Detectar la presencia de una señal del primer marcador detectable, el segundo marcador detectable y el tercer marcador detectable para cada célula de sondeo,

en donde en una célula de sondeo no humana la presencia de una señal del primer marcador detectable y la presencia de una señal del segundo marcador detectable indica la presencia de la primera especie de anticuerpos humanos en la muestra, y/o en donde en una célula de sondeo la presencia de una señal del primer marcador detectable y la presencia de una señal del tercer marcador detectable indica la presencia de la segunda especie de anticuerpo humano en la muestra.

El método anterior puede expandirse aún más mediante la adición de especies celulares de sondeo no humanas (iv, v, vi, etc.) que tienen los respectivos marcadores detectables cuarto, quinto, sexto, etc. para proporcionar un método que sea capaz de detectar tres, cuatro, cinco o más especies de anticuerpos humanos. En este caso, como también se explicó anteriormente, todos los marcadores detectables del primero al quinto o más deben ser distinguibles.

Otro aspecto de la invención se refiere entonces a un sistema de detección de anticuerpos humanos, que comprende una o más especies celulares de sondeo no humanas y un agente de unión a anticuerpos, caracterizado porque el agente de unión a anticuerpos está acoplado a un primer marcador detectable y puede unirse a humanos anticuerpos, y cada una de las una o más de las especies celulares de sondeo no humanas expresa o puede expresar una proteína antigénica distinta, en donde dicha proteína antigénica distinta comprende una porción antigénica distinta que puede unirse a, o está unida por, una especie distinta de anticuerpos humanos a detectar, y un segundo marcador detectable, en donde el segundo marcador detectable es diferente (es decir, distinguible de) de cualquier otro marcador detectable de otras especies celulares de sondeo no humanas en el sistema, y en donde una señal de una segunda especie de marcador detectable en el sistema indica la presencia de la proteína antigénica correspondiente en la célula de sondeo.

En una modalidad preferida el sistema de detección de anticuerpos de acuerdo con la invención se proporciona con marcadores fluorescentes como se describe en la presente descripción en otro lugar como el primer y/o segundo marcador detectable.

En correspondencia con el método de la invención descrito anteriormente, también puede expandirse en modalidades preferidas el sistema de detección de anticuerpos para proporcionar un sistema expandido que sea capaz de detectar una pluralidad de especies de anticuerpos humanos (dos, tres, cuatro, cinco a diez o más). Con el fin de expandir el sistema, se incluyen más especies celulares de sondeo no humanas que son similares a las otras especies celulares de sondeo no humanas pero que tienen especificidades distintas para las especies de anticuerpos humanos adicionales a detectar

y marcadores detectables distintos adicionales (tercero, cuarto, etc.), que se distinguen preferentemente de cualquiera de los otros marcadores detectables en el sistema.

A este respecto, se prefiere un sistema de detección de anticuerpos en donde el sistema comprende dos, tres, cuatro, cinco, diez o más especies celulares de sondeo no humanas, y en donde cada especie celular de sondeo no humana no expresa endógenamente ninguna de las proteínas antigénicas de cualquiera de las especies celulares de sondeo en el sistema.

Las ventajas de un método y sistema para la detección de una pluralidad de especies de anticuerpos humanos distintas en una muestra es que el uso del método o sistema de la invención permite el análisis de la presencia de una pluralidad de especies de anticuerpos humanos al mismo tiempo.

Otro aspecto de la invención se refiere entonces a un kit de diagnóstico, que comprende el sistema de detección de anticuerpos como se describe en la presente descripción anteriormente. El kit de diagnóstico de la invención es preferentemente para su uso en un método como se describe en la presente descripción anteriormente.

Otro aspecto de la invención se refiere entonces a un uso del método, el sistema de detección de anticuerpos humanos o el kit de diagnóstico de acuerdo con las diversas modalidades y aspectos de la invención, en el diagnóstico de un estado clínico, afección o enfermedad que se caracteriza por la presencia de una o más especies de anticuerpos humanos en una muestra biológica de un sujeto a diagnosticar. El uso es preferentemente un uso *in vitro* o *ex vivo*.

El segundo problema anterior de la invención se resuelve en un primer aspecto mediante un método para eliminar una especie de anticuerpos humanos de una muestra, que comprende

a. poner en contacto una muestra que se sospecha que tiene la especie de anticuerpo con una especie celular de captura no humana en condiciones que permiten que la especie de anticuerpo se una a la especie celular de captura y forme una especie compleja de anticuerpo y célula de captura, y en donde la especie celular de captura expresa, o puede expresar, una proteína antigénica que tiene una porción antigénica que se une puede ser unida por las especies de anticuerpos, y

b. posteriormente, eliminar la especie de complejo de anticuerpo y célula de captura de la muestra para obtener una muestra purificada.

c. *opcionalmente*, volver a sondear las especies celulares de captura con un marcador detectable que permita la detección de anticuerpos unidos a la superficie de las especies celulares de captura.

La definición del término "muestra" en este aspecto es similar a la definición de muestra proporcionada anteriormente para los otros aspectos de la invención.

En algunas modalidades las especies de anticuerpos y las especies celulares de captura se derivan de diferentes organismos, por ejemplo, cuando la especie de anticuerpo a eliminar es humana, la especie celular de captura se selecciona de una especie no humana, por ejemplo, ratón. Con esta modalidad, se pretende evitar las reactividades cruzadas de las especies celulares de captura con anticuerpos que podrían estar presentes en la muestra a purificar.

Alternativamente, el método anterior incluye que la especie celular de captura no expresa endógenamente la proteína antigénica.

En algunas modalidades, la eliminación de las especies complejas del anticuerpo y células de captura se realiza mediante centrifugación o filtrado y separación del sobrenadante libre de células. Cómo separar el material celular de los líquidos es bien conocido en la técnica. Preferentemente, el método de separación no daña ni destruye las especies celulares de captura.

En algunas modalidades, el método comprende, además:

d. probar la muestra purificada para detectar la presencia de anticuerpos de la especie de anticuerpo humano, en donde, en el caso de la presencia de anticuerpos residuales de la especie de anticuerpos humanos a eliminar, las etapas del método (a) a (b), y opcionalmente (c), se repiten hasta que la muestra purificada esté desprovista de cualquier anticuerpo residual de las especies de anticuerpos humanos.

Por ejemplo, en algunas modalidades preferidas, la etapa (d) comprende un método de detección de anticuerpos como se describe en la presente descripción anteriormente, o un ensayo de tamizaje de anticuerpos convencional.

De manera similar a los aspectos anteriores relacionados con la detección de anticuerpos, también en este aspecto de la eliminación de anticuerpos, las especies de anticuerpos humanos a eliminar son preferentemente un anticuerpo que se une a un antígeno de los grupos sanguíneos, y en donde la muestra es una muestra de suero. Para ver ejemplos más específicos de tales antígenos, consulte la descripción anterior.

Preferentemente, el método es un método *ex vivo* o *in vitro*.

En otros aspectos de la invención también está comprendido un sistema de eliminación de anticuerpos humanos para usar en el método anterior, el sistema comprende una o más especies celulares de captura no humanas, en donde la especie celular de captura expresa, o puede expresar, una proteína antigénica que tiene una porción antigénica que se une o puede ser unido, por una especie de anticuerpos humanos que se eliminará de una muestra.

La presente invención se describirá ahora aún más en los siguientes ejemplos con referencia a las figuras y secuencias adjuntas, sin embargo, sin limitarse a las mismas. Para los fines de la presente invención, todas las referencias citadas en la presente descripción están en su totalidad. En las Figuras:

Figura 1: Principio de la nueva prueba de identificación de anticuerpos contra el grupo sanguíneo. Los detalles se proporcionan en la sección de ejemplos.

Figura 2: Ejemplo representativo, que ilustra la prueba de concepto de la invención propuesta: las células que no expresan ningún antígeno y ningún fluorocromo (control negativo) se representan en azul, las células que coexpresan el "antígeno A" y la fluorescencia roja se muestran en gris oscuro y las células que coexpresan "antígeno B" y fluorescencia verde se muestran en gris claro. La fluorescencia media de APC en los tres paneles de la izquierda es la misma, lo que indica la ausencia de anticuerpos anti-"antígeno A" y anti-"antígeno B" en el suero analizado de un donante aleatorio. En los tres paneles de la derecha, la fluorescencia de APC se desplaza hacia la derecha (positiva) en el panel central, lo que indica que el suero analizado contiene el anticuerpo contra el "antígeno A". En este ejemplo, "antígeno A" es el antígeno Fy(a) del sistema del grupo sanguíneo Duffy, "antígeno B" es su contra-antígeno, Fy(b). Anti-Fy(a) es un alo-anticuerpo relativamente común en pacientes con transfusión múltiple.

Figura 3: Principio del método de absorción de especificidades de anticuerpos específicos de sueros poliaglutinantes de acuerdo con la invención.

Figura 4: Ejemplo representativo, que ilustra la prueba de concepto de la invención propuesta con respecto a la reducción selectiva de anticuerpos del suero poliaglutinantes mientras que retiene anticuerpos cualitativamente y cuantitativamente contra las otras especificidades.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Los ARNM para antígenos de los grupos sanguíneos se aíslan del ARN total aislado de células sanguíneas hematopoyéticas inmaduras de médula ósea, sangre de cordón o sangre periférica movilizada. El ADNc se genera mediante el uso de oligonucleótidos específicos, aleatorios o poli-A. Los oligonucleótidos pueden contener sitios de restricción para la inserción en el vector de elección. El antígeno de los grupos sanguíneos codificado por el ADNc se analiza mediante secuenciación. O el antígeno de los grupos sanguíneos de elección está aislado previamente, o puede ser generado por mutagénesis específica del sitio. Los ADNc pueden optimizarse con codones si así se desea. El ADNc del antígeno de los grupos sanguíneos se inserta en los vectores de expresión que comprenden genes indicadores fluorescentes, los vectores de expresión se amplifican, se confirman su identidad mediante secuenciación de longitud completa, se transducen en células diana. Las células diana son células inmortalizadas que crecen continuamente en cultivo celular de origen xenogénico o de origen humano pero que no expresan ningún antígeno de los grupos sanguíneos.

Las células se transducen, se clasifican mediante citometría de flujo en función de la expresión de fluorocromo y después se expanden. La expresión del antígeno se evalúa (confirma) mediante análisis de ADN (secuenciación), ARNm (secuenciación), fluorescencia indirecta o directa mediante análisis por citometría de flujo de células teñidas con anticuerpo específico de antígeno de los grupos sanguíneos, conjugado directamente o indirectamente con fluorocromos. Se considera la clasificación de las células si la población no es homogénea con respecto al antígeno de los grupos sanguíneos y la expresión de fluorocromo. Los expresores más altos se clasificarán, si corresponde.

Una mezcla celular se genera típicamente (pero no necesariamente) con frecuencias iguales de células que expresan cada uno de los diferentes antígenos que se supone que están representados en el panel. Las combinaciones de antígenos razonables serían antígenos de alta frecuencia o de baja frecuencia, pares de antígenos, antígenos contra los cuales se dirigen con frecuencia los anticuerpos, panel(es) de rutina que representan antígenos obligatorios, pero cualquier otra combinación es igualmente factible. Los paneles específicos representarán solo antígenos de granulocitos (HNA) o antígenos de plaquetas (HPA); el panel completo de antígenos conocidos actualmente estará representado en cada uno de los paneles. Por lo tanto, se generarán kits de diagnóstico que contienen células mixtas que representan paneles definidos de antígenos, así como también anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromo y tampones necesarios. Para los antígenos observados con frecuencia como que dificultan la identificación de anticuerpos, específicamente antígenos como Rh "D", Rh "e", Kell "k", etc., se generarán de manera similar paneles de absorción específicos como se describió anteriormente.

El suero con especificidades de anticuerpos conocidas (durante la generación de las células, paneles y mezclas, así como también durante la validación formal) o el suero de pacientes que se sospecha que tiene anticuerpos contra los antígenos de los grupos sanguíneos se incuban con la mezcla celular. Las células se incuban a temperatura ambiente o más alta

(hasta 37 °C) o más fría (tan baja como 4 °C). La mezcla de suero y células se lava al menos una vez, posteriormente se incuba con anticuerpo anti-IgG humana-fluorescencia acoplada y/o anticuerpo anti-IgM humana-fluorescencia acoplada. Hasta el momento, se usó anticuerpo anti-IgG-APC, pero puede usarse cualquier otro fluorocromo siempre que no entre en conflicto con el de las células individuales en la mezcla celular y pueda usarse cualquier otro anticuerpo anti-inmunoglobulina humana. Diferentes anticuerpos anti-isotipo humano podrán determinar el isotipo del anticuerpo del paciente y, por lo tanto, su potencial hemolítico. Las células se lavan nuevamente al menos una vez, después se someten a citometría de flujo. Se evalúan el(los) color(es) de fluorescencia adicionales de las células positivas para APC. Si, por ejemplo, se observa un desplazamiento en la positividad para APC en las células que expresan un fluorocromo rojo, entonces el suero contiene un anticuerpo contra el antígeno de los grupos sanguíneos expresado en las células fluorescentes rojas ("antígeno A" en nuestro ejemplo, Figuras 1+2). El suero podría contener anticuerpos contra varias especificidades, por lo que las células de varios colores de fluorescencia podrían desplazarse a la derecha. El suero puede ser sustituido por plasma.

Ejemplo 1: Detección de anticuerpos

La figura 1 ilustra un sistema de prueba de ejemplo de acuerdo con la invención descrita en la presente descripción. Mediante el uso de vectores bi o tri-cistrónicos, que portan un casete de expresión del antígeno de los grupos sanguíneos en el primer y al menos un casete de expresión del fluorocromo en el segundo y/o tercer sitio de clonación, un antígeno de los grupos sanguíneos de elección se coexpresará con uno o más fluorocromos. La transducción de los casetes de expresión se realizará con vectores virales o no virales; en lugar de vectores bi- o tri-cistrónicos, la transducción concurrente de vectores de expresión del antígeno de los grupos sanguíneos y del fluorocromo puede realizarse alternativamente al uso de vectores multi-cistrónicos. De esta manera, las células que expresan "antígeno A" como único antígeno de los grupos sanguíneos serán reconocidas por su fluorescencia roja, las células que expresan "antígeno B" como verde, etc. Está disponible un gran panel de fluorocromos que pueden combinarse en todas las combinaciones posibles, permitiendo la generación de poblaciones de células mixtas con, en principio, un número infinito de antígenos diferentes a probar en una sola reacción.

Como se ilustra en la figura 1, los sueros de pacientes que contienen, entre todas las demás especificidades de IgG, anticuerpos anti-"antígeno A" se incubarán con la mezcla celular (que contiene, por el bien del ejemplo, solo células que no expresan antígeno ni fluorocromo (fondo/control negativo), células que coexpresan "antígeno A" y fluorescencia roja y células que coexpresan "antígeno B" y fluorescencia verde). La célula fluorescente roja que expresa el "antígeno A" se unirá al anticuerpo anti-"antígeno A" del suero. A continuación, se incuba un anticuerpo anti-IgG humana secundario con marcador de fluorescencia APC con la mezcla celular. Solamente la célula decorada con anti-"antígeno A" (que contiene fluorescencia roja) se unirá al anticuerpo secundario. La fluorescencia de APC se medirá mediante citometría de flujo. Solo la población de células que expresan fluorescencia roja (portadora del "antígeno A") será positiva para APC.

Los resultados se representan en la figura 2. La fluorescencia media de APC en los tres paneles de la izquierda es la misma, lo que indica la ausencia de anticuerpos anti-"antígeno A" y anti-"antígeno B" en el suero analizado de un donante aleatorio. En los tres paneles de la derecha, la fluorescencia de APC se desplaza hacia la derecha (positiva) en el panel central, lo que indica que el suero analizado contiene el anticuerpo contra el "antígeno A". En este ejemplo, "antígeno A" es el antígeno Fy(a) del sistema del grupo sanguíneo Duffy, "antígeno B" es su contra-antígeno, Fy(b). Anti-Fy(a) es un alo-anticuerpo relativamente común en pacientes con transfusión múltiple.

Ejemplo 2: Absorción selectiva de anticuerpos

Los sueros de pacientes pueden contener más de una especificidad de anticuerpos contra antígenos de los grupos sanguíneos; en el ejemplo dado como se ilustra en la figura 3, anticuerpos contra los antígenos de los grupos sanguíneos A y X. La presencia de anti-A puede enmascarar la presencia de anticuerpos contra otros antígenos de los grupos sanguíneos, o muy pocos RBC de prueba que no sean negativos para el antígeno A (y por lo tanto "reactivo" y, por lo tanto, no contributivo) pueden obstaculizar la exclusión del panel completo de reactividades de antígeno de los grupos sanguíneos requeridas por las directrices. En tal situación, la absorción de una especificidad puede ser útil.

Los sueros poliaglutinantes de pacientes (en este ejemplo, que contienen anti-A y anti-X), por lo tanto, se incubarán con células que expresan un único antígeno, en este caso el antígeno A. El suero residual se recuperará y se someterá a una prueba convencional de anticuerpos contra los grupos sanguíneos. La expectativa es que los RBC que expresan el antígeno A (pero no el antígeno X) se volverán no reactivos, mientras que los RBC que expresan el antígeno X seguirán siendo reactivos. El ensayo no hace uso de la proteína fluorescente coexpresada, aunque podría considerarse la incubación de las células que expresan el antígeno A recuperadas con anti-IgG-APC y el análisis de citometría de flujo posterior para confirmación.

Los resultados se muestran en la figura 4. En este ejemplo, los anticuerpos contenidos en suero del paciente se dirigen a dos especificidades de los grupos sanguíneos, Fy(a) y K (antígeno Kell (KEL1) del sistema del grupo sanguíneo Kell). La reactividad contra los RBC de prueba negativos para K, homocigotos para Fy(a) se muestra en el panel superior de la columna de gel izquierda. La sutil reacción positiva en la columna de gel derecha se dirige contra los RBC heterocigotos para Kell, homocigotos para Fy(b) (es decir, negativos para Fy(a)). La incubación de las células murinas que expresan Fy(a) (la invención) en el suero del paciente, seguido de la precipitación de las células y la incubación del sobrenadante

con los mismos RBC de prueba muestra la ausencia de reactividad en la columna izquierda (el anti-Fy(a) se ha eliminado por completo) pero la misma fuerza de reacción con las células en la columna derecha. Por lo tanto, el anticuerpo anti-K de bajo título se retuvo cuantitativamente. Como una segunda línea que demuestra la especificidad del ejercicio de absorción, se incubó el mismo suero con células que expresan Fy(b); se conservaron ambas especificidades de anticuerpos.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para la detección de una o más especies de anticuerpos humanos en una muestra, el método comprende
   a. poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene la una o más especies de anticuerpos humanos con una o más especies celulares de sondeo no humanas y un agente de unión a anticuerpos,
      i. en donde el agente de unión a anticuerpos está acoplado a un primer marcador detectable y puede unirse a anticuerpos humanos, y
      ii. en donde una célula de sondeo de la especie celular de sondeo no humana expresa, o puede expresar, un segundo marcador detectable y una proteína antigénica, la proteína antigénica comprende una porción antigénica que puede unirse, o puede estar unida por, un anticuerpo de la una o más especies de anticuerpos humanos a detectar; y
   b. detectar la presencia de una señal del primer marcador detectable y el segundo marcador detectable para cada célula de sondeo, en donde la presencia de una señal del primer marcador detectable y la presencia de una señal del segundo marcador detectable indica la presencia de una o más especies de anticuerpos humanos en la muestra.

2. Un método *in vitro* para la detección de una o más especies de anticuerpos humanos en una muestra, el método comprende
   a. poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene la una o más especies de anticuerpos humanos con una o más especies celulares de sondeo no humanas y un agente de unión a anticuerpos,
      i. en donde el agente de unión a anticuerpos está acoplado a un primer marcador detectable y puede unirse a anticuerpos humanos, y
      ii. en donde una célula de sondeo de una especie celular de sondeo no humana se inmoviliza en una ubicación predeterminada en un sustrato sólido, y en donde la célula de sondeo expresa, o puede expresar, una proteína antigénica, la proteína antigénica comprende una porción antigénica que puede unirse, o puede estar unida por, un anticuerpo de la una o más especies de anticuerpos humanos a detectar; y
   b. detectar la presencia de una señal del primer marcador detectable para cada célula de sondeo inmovilizada en el sustrato sólido, en donde la presencia de una señal del primer marcador detectable en una ubicación predeterminada en el sustrato sólido indica la presencia de la una o más especies de anticuerpos humanos en la muestra.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la especie celular de sondeo es una célula que no expresa endógenamente la proteína antigénica ni ninguna otra proteína que pueda estar unida por la una o más especies de anticuerpos a detectar, tal como una célula de ratón, o alternativamente una célula que no es de mamífero, con la máxima preferencia una célula de invertebrado, tal como una célula de insecto.

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho primer marcador detectable y segundo marcador detectable producen señales que son distinguibles.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha una o más especies de anticuerpos humanos es una especie de anticuerpos humanos específica para un antígeno de los grupos sanguíneos, y en donde la proteína antigénica es el antígeno de los grupos sanguíneos correspondiente.

6. Un sistema de detección de anticuerpos humanos, que comprende una o más especies celulares de sondeo no humanas y un agente de unión a anticuerpos, caracterizado porque el agente de unión a anticuerpos está acoplado a un primer marcador detectable y puede unirse a anticuerpos humanos, y cada una de la una o más especies celulares de sondeo no humanas expresan o pueden expresar una proteína antigénica distinta, en donde dicha proteína antigénica distinta comprende una porción antigénica distinta que puede unirse, o está unida por, una especie distinta de anticuerpos humanos a detectar, y un segundo marcador detectable, en donde el segundo marcador detectable es diferente (es decir, distinguible de) de cualquier otro marcador detectable de otras especies celulares de sondeo no humanas en el sistema, y en donde una señal de una segunda especie de marcador detectable en el sistema indica la presencia de la proteína antigénica correspondiente en la célula de sondeo.

7. El sistema de detección de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el sistema comprende dos, tres, cuatro, cinco o más especies celulares de sondeo no humanas, y en donde cada especie celular de sondeo no humana no expresa endógenamente ninguna de las proteínas antigénicas de cualquiera de las especies celulares de sondeo en el sistema.

8. Un kit de diagnóstico, que comprende el sistema de detección de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7.

9. El kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 8, para usar en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

10. Un uso *in vitro* del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el sistema de detección de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, o un kit de diagnóstico de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en el diagnóstico de una enfermedad que se caracteriza por la presencia de una o más especies de anticuerpos humanos en una muestra biológica de un sujeto a diagnosticar.

11. Un método *in vitro* para eliminar una especie de anticuerpos humanos de una muestra, que comprende
a. poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene la especie de anticuerpo con una especie celular de captura no humana en condiciones que permitan que la especie de anticuerpo se una a la especie celular de captura y forme una especie de complejo de anticuerpo y célula de captura, y en donde la especie celular de captura expresa, o puede expresar, una proteína antigénica que tiene una porción antigénica que se une o puede ser unida por la especie de anticuerpo, y
b. posteriormente, eliminar la especie de complejo de anticuerpo y célula de captura de la muestra para obtener una muestra purificada.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la especie celular de captura es ratón, o en donde la especie celular de captura no expresa endógenamente la proteína antigénica.

13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, en donde el método comprende, además:
c. analizar la muestra purificada para determinar la presencia de anticuerpos de las especies de anticuerpos humanos,
en donde en el caso de una presencia de anticuerpos residuales de las especies de anticuerpos humanos a eliminar, las etapas del método (a) a (b), y opcionalmente (c), se repiten hasta que la muestra purificada esté desprovista de cualquier anticuerpo residual de las especies de anticuerpos humanos.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la etapa (c) comprende un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un ensayo de tamizaje de anticuerpos convencional.

15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde la especie de anticuerpos humanos a eliminar es un anticuerpo que se une a un antígeno de los grupos sanguíneos, y en donde la muestra es una muestra de suero.

Figura 1:

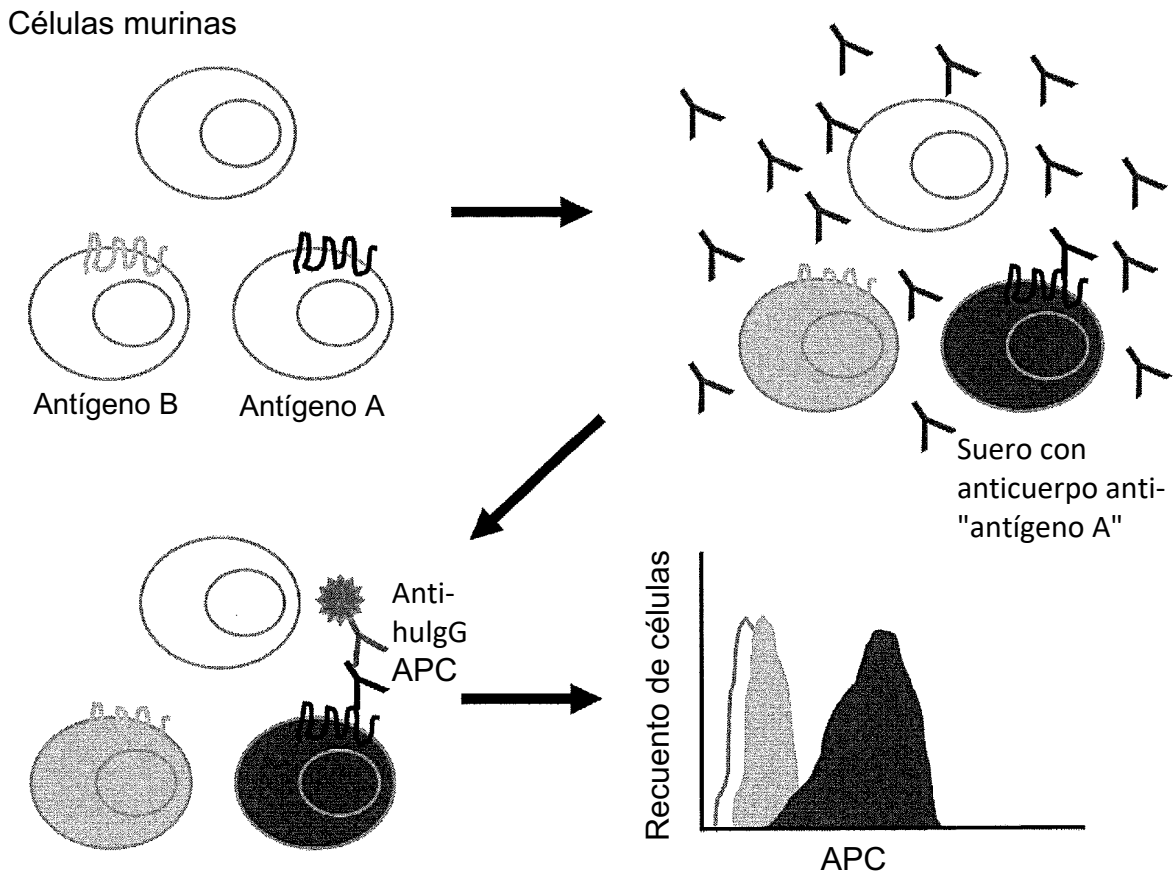
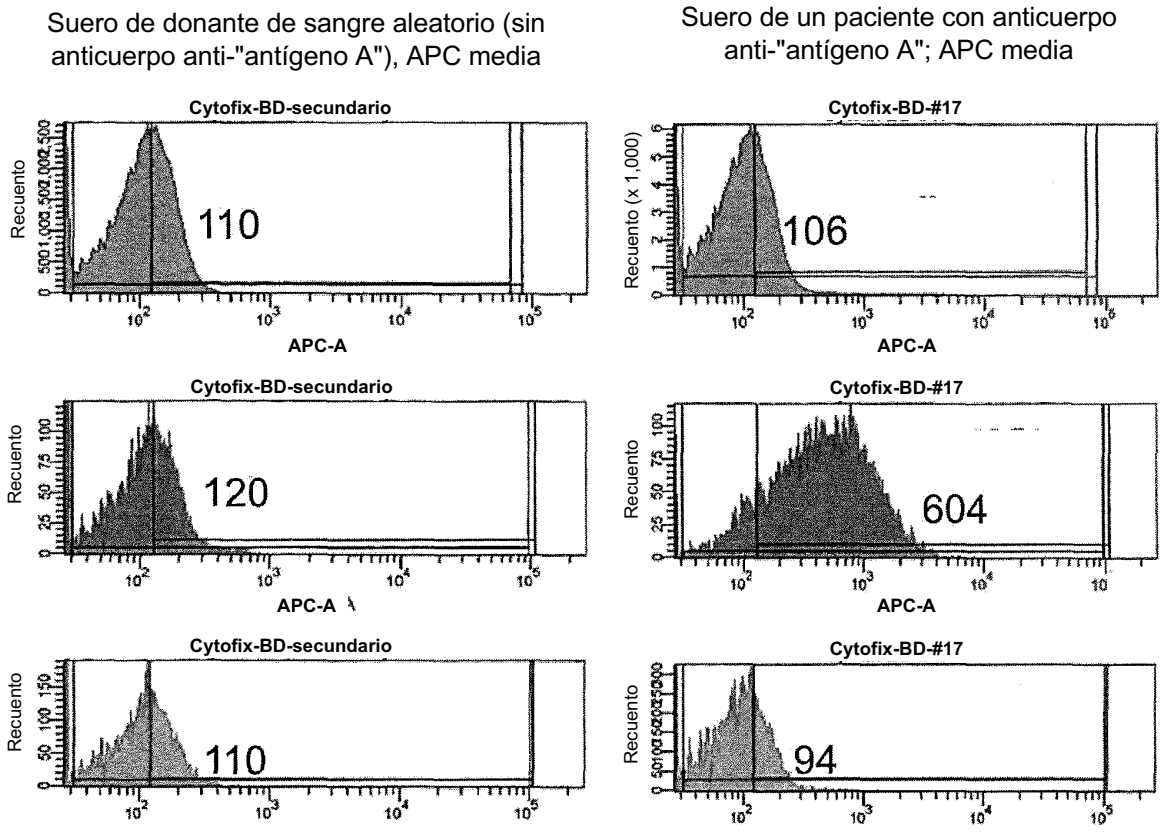

Células murinas
Antígeno B
Antígeno A
Suero con anticuerpo anti-"antígeno A"
Anti-hulgG APC
Recuento de células
APC

Figura 2:



Antígeno A: Fy(a) del sistema del grupo sanguíneo Duffy

Figura 3:

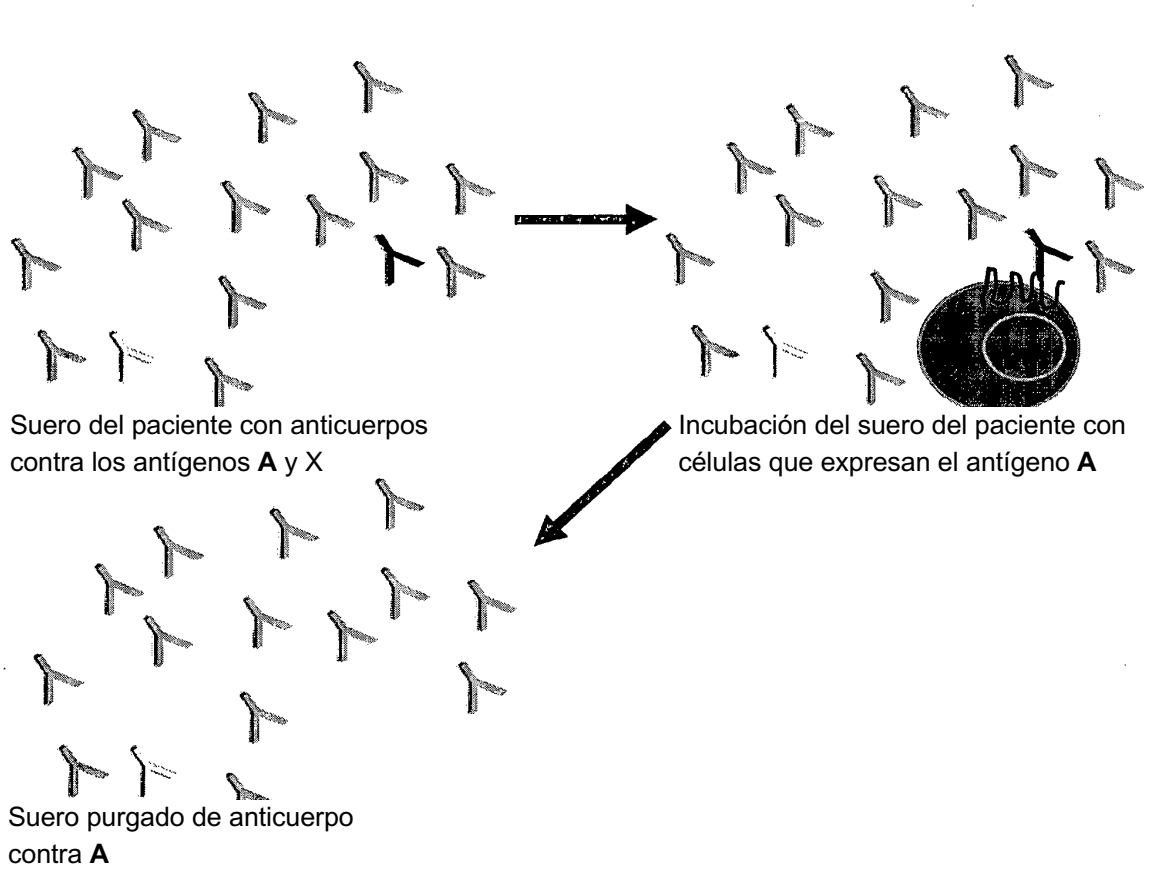
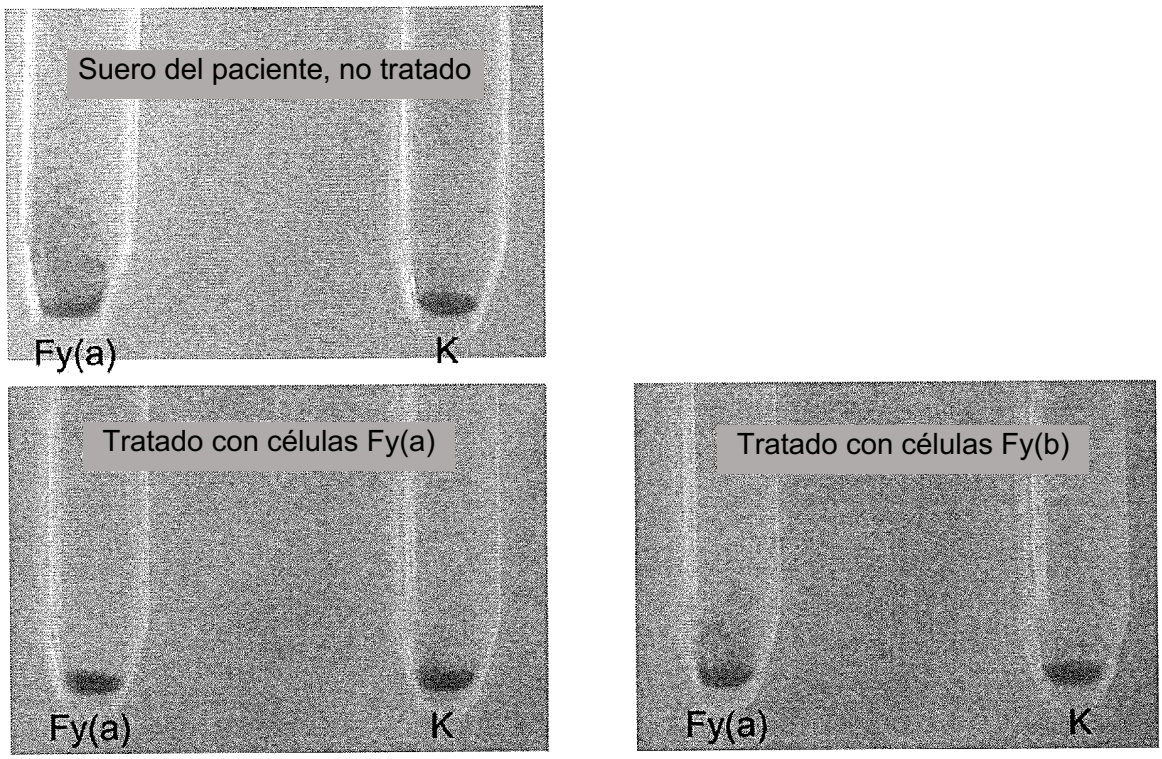

Suero del paciente con anticuerpos contra los antígenos **A** y X
Incubación del suero del paciente con células que expresan el antígeno **A**
Suero purgado de anticuerpo contra **A**

Figura 4:


Suero del paciente, no tratado
Fy(a)
K
Tratado con células Fy(a)
Fy(a)
K
Tratado con células Fy(b)
Fy(a)
K