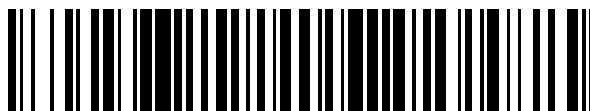


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 255**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2013** **PCT/EP2013/074407**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014** **WO14079946**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2013** **E 13792933 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019** **EP 2923208**

54 Título: **Métodos para determinar el riesgo de enfermedad aguda del injerto contra el hospedador**

30 Prioridad:

21.11.2012 EP 12306445

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2019

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (20.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (20.0%);
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS
(20.0%);
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (20.0%) y
IMAGINE INSTITUT DES MALADIES
GÉNÉTIQUES NECKER ENFANTS MALADES
(20.0%)**

72 Inventor/es:

**HERMINE, OLIVIER;
RUBIO, MARIE THÉRÈSE;
BOUILLIE, MARIE y
LEITE DE MORAES, MARIA**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 719 255 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

Métodos para determinar el riesgo de enfermedad aguda del injerto contra el hospedador.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a métodos y productos correspondientes (por ejemplo, kits) para la predicción del riesgo de enfermedad aguda del injerto contra el hospedador, así como métodos correspondientes para seleccionar un donante de trasplante y para ajustar el tratamiento asociado a dicha predicción de riesgo.

10

Antecedentes de la invención

Entre las primeras líneas de la terapia para las neoplasias malignas hematológicas se incluyen de manera general la quimioterapia y/o la quimio-inmunoterapia con anticuerpos monoclonales. Sin embargo, algunos

15

pacientes experimentan una recaída o progresión de la enfermedad y en ocasiones se vuelven refractarios al tratamiento estándar.

La terapia inmunológica, incluyendo el trasplante de células troncales (SCT) alogénicas representa una manera alternativa de terapia para estos pacientes, quienes resultan difíciles de curar o menos probablemente curados con la quimioterapia estándar. El trasplante de células troncales hematopoyéticas (HSCT) es una terapia que implica obtener células troncales hematopoyéticas de un donante o de sangre del cordón umbilical e infundirlas por vía intravenosa en el receptor acondicionado para aceptar el trasplante. Sin embargo, la tasa de supervivencia global posterior al trasplante todavía es de sólo 40% a 60% debido a graves complicaciones post-trasplante, incluyendo enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD). GVHD es un nombre genérico para enfermedades que están causadas por la reacción inmunológica de células inmunocompetentes transferidas o trasplantadas (por ejemplo, células T maduras) contra tejidos del hospedador y que pueden inducir toxicidad orgánica severa que conduce a la muerte en algunos casos.

20

25

Por lo tanto, la compatibilidad de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) resulta esencial para reducir el riesgo de rechazo de trasplante y GVHD. Sin embargo, los genes no HLA también presentan un impacto sobre el resultado del trasplante y GVHD puede resultar mortal incluso en pacientes que reciben trasplantes de donantes hermanos compatibles (MSD) de HLA idénticos. Además, los MSD sólo se encuentran disponibles durante aproximadamente un tercio de los pacientes y, por lo tanto, se requieren donantes alternativos. Los donantes no emparentados de HLA compatible (MUD) se utilizan más ampliamente que la sangre de cordón umbilical o donantes emparentados no compatibles, aunque el riesgo de GVHD también debe tomarse en consideración para pacientes que reciben trasplantes de MUD.

30

35

De acuerdo con lo anterior, todavía existe una necesidad de métodos útiles para predecir el riesgo de desarrollar aGVHD en pacientes que reciben un trasplante (o a la inversa, métodos para determinar si un donante candidato está en riesgo de inducir GVHD en un receptor).

40

El documento WO 2009/062160 describe un método para determinar la probabilidad de un sujeto de desarrollar GVHD tras recibir un trasplante de células troncales hematopoyéticas alogénicas (HSCT), que implica determinar la concentración plasmática de RANTES o MCP-A en un donante o en un sujeto, y compararla con una concentración predeterminada de RANTES o MCP-1.

45

Recientemente, dos estudios retrospectivos han demostrado la relevancia clínica de las células NKT invariantes (iNKT) en la predicción de enfermedad aguda del injerto contra el hospedador (GVHD) mediante el análisis de la distribución de frecuencias de linfocitos efectores y reguladores en células troncales sanguíneas periféricas (PBSC) de receptores de HSCT alogénico (Rubio *et al.*, Blood, 2012) o de injertos del donante (Chaidos *et al.*, 2012). Se demostró que una reconstitución alterada de las células iNKT en los receptores o una dosis baja de células iNKT-CD4 en el injerto representan parámetros independientes que pueden predecir significativamente la incidencia de aGVHD posterior al HSCT.

50

Sin embargo, un método que predice el riesgo de desarrollar aGVHD basado en la determinación directa en muestras de sangre o injerto de células iNKT no resulta satisfactorio para el médico ya que el umbral entre un número bajo y un número alto de células iNKT resulta difícil de determinar, conduciendo por ejemplo a un riesgo de error de resultados intermedios.

55

60 **Sumario de la invención**

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para determinar si un donante candidato de trasplante humano está en riesgo de inducir enfermedad aguda de injerto contra el hospedador (aGVHD) en un receptor de trasplante humano, que comprende las etapas de: i) expandir la población de células NKT invariantes (iNKT) procedentes de una muestra biológica obtenida del donante candidato de trasplante humano, ii) detectar la presencia o ausencia de expansión de la subpoblación de células iNKT CD4- en la población obtenida en la

65

etapa i), e iii) concluir que el donante candidato de trasplante humano presenta un riesgo incrementado de inducción de aGVHD en un receptor de trasplante humano cuando la subpoblación de células iNKT CD4- no se expande a partir de la población de células iNKT.

- 5 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para seleccionar un donante de trasplante humano con el fin de reducir el riesgo de inducir una aGVHD en un receptor de trasplante humano, que comprende las etapas siguientes: (i) llevar a cabo el método de determinar el riesgo según la invención, e (ii) seleccionar dicho donante de acuerdo con dicha determinación de riesgo.
- 10 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para ajustar el tratamiento inmunosupresor administrado en un receptor trasplantado humano tras su trasplante de injerto, que comprende las etapas siguientes: (i) realización del método para determinar el riesgo según la invención, e (ii) ajuste del tratamiento inmunosupresor.
- 15 En la presente memoria también se describe un kit para llevar a cabo los métodos según la invención anteriormente descritos.

Descripción detallada de la invención

- 20 En el contexto de la presente invención se ha demostrado que una etapa anterior de expansión durante 12 o 15 días de la población de células iNKT a partir de un injerto de PBSC o una muestra de sangre obtenida de un donante candidato antes de analizar la capacidad de expansión de la subpoblación de células iNKT CD4- permite determinar con seguridad si dicho candidato donante está en riesgo de inducir GVHD aguda en un receptor. En efecto, después de dicha expansión, existen únicamente dos posibilidades diferentes: la subpoblación de células
- 25 iNKT CD4- no se ha expandido (factor de expansión ≤ 1) a partir de la población de células iNKT y, por lo tanto, el donante presenta un riesgo incrementado de inducir GVHD aguda en el receptor, o la subpoblación de células iNKT CD4- se ha expandido significativamente (factor de expansión >1) a partir de la población de células iNKT y, por lo tanto, el donante prácticamente no presenta riesgo de inducir GVHD aguda en el receptor.

30 *Un método para determinar el riesgo de enfermedad aguda de injerto contra el hospedador (aGVHD)*

- De acuerdo con lo anterior, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para determinar si un donante candidato de trasplante humano está en riesgo de inducir enfermedad aguda de injerto contra el hospedador (aGVHD) en un receptor de trasplante humano, que comprende las etapas de: i) expandir la
- 35 población de células NKT invariantes (iNKT) procedentes de una muestra biológica obtenida del donante candidato de trasplante humano, ii) detectar la presencia o ausencia de expansión de la subpoblación de células iNKT CD4- en la población obtenida en la etapa i), e iii) concluir que el donante candidato de trasplante humano presenta un riesgo incrementado de inducción de aGVHD en un receptor de trasplante humano cuando la subpoblación de células iNKT CD4- no se expande a partir de la población de células iNKT.

- 40 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “riesgo” se refiere a la probabilidad de que se produzca un suceso durante un periodo de tiempo específico, tal como la aparición de GVHD aguda (aGVHD) y puede referirse al riesgo “absoluto” o al “riesgo relativo” de un sujeto. El riesgo absoluto puede medirse en referencia a la observación real posterior a la medición para la cohorte temporal relevante o en referencia a los valores de
- 45 índice desarrollados a partir de cohortes históricos estadísticamente válidas que se han seguido durante el periodo de tiempo relevante. El riesgo relativo se refiere a la proporción de riesgos absolutos de un sujeto en comparación con los riesgos absolutos de cohortes de bajo riesgo o con un riesgo poblacional medio, que puede variar en cómo se evalúan los riesgos de factor clínico. Los cocientes de probabilidades, la proporción de sucesos positivos a sucesos negativos para un resultado de ensayo dado, también se utilizan comúnmente (las
- 50 probabilidades se calculan según la fórmula $p/(1-p)$, en la que p es la probabilidad de un suceso y $(1-p)$ es la probabilidad de no darse el suceso) respecto a no conversión.

- La “determinación de riesgos” en el contexto de la presente invención comprende realizar una predicción de la probabilidad o cociente de probabilidades de que se produzca un suceso. La determinación de riesgos puede
- 55 comprender además la predicción de futuros parámetros clínicos, valores tradicionales de factor de riesgo de laboratorio u otros índices de aGVHD, tales como edad, no correspondencia de sexo, ensayos de HLA, etc., en términos absolutos o relativos en referencia a una población previamente medida. Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para realizar mediciones categóricas del riesgo de inducción de aGVHD en un receptor de trasplante, definiendo de esta manera el espectro de riesgos de una categoría de donantes de
- 60 trasplante definida como en riesgo de inducción de aGVHD o no y, de esta manera, resulta útil para seleccionar un donante seguro.

- Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “donante de trasplante” se refiere a un sujeto del que se extrae un órgano, tejido o célula que debe trasplantarse. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión
- 65 “receptor de trasplante” se refiere a un sujeto que recibirá un órgano, tejido o célula trasplantado. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “trasplante” (o “injerto”) se refiere a células, tejido u órgano libre (no

adheridos) integrado en un tejido tras el trasplante en un sujeto. Dentro del contexto del trasplante de células troncales hematopoyéticas (HSCT), el trasplante son células troncales hematopoyéticas multipotentes, habitualmente derivadas de sangre periférica tras la movilización por G-CSF, médula ósea o sangre de cordón umbilical.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier muestra aislada de un sujeto (por ejemplo, un donante de trasplante), preferentemente una muestra que contiene células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Entre los ejemplos de dichas muestras se incluyen líquidos, tejidos, muestras celulares, órganos, biopsias, etc. Las muestras más preferentes son muestras de sangre, muestras de sangre del cordón o muestras de injerto (por ejemplo, una muestra de injerto de células troncales de sangre periférica (PBSC) o una muestra de injerto de médula ósea (BM)).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "muestra de sangre" se refiere a una muestra que incluye sangre completa, plasma y suero.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "células NKT", células T asesinas naturales se refiere a una subpoblación de linfocitos y más particularmente a un subgrupo único de células T restringidas a CD1d que proporcionan un enlace entre las respuestas inmunológicas innatas y adaptativas. En efecto, las células NKT, que coexpresan un receptor de células T y marcadores de células NK, resultan esenciales para varios aspectos de la inmunidad en diversas enfermedades inmunológicas, incluyendo enfermedades autoinmunitarias, enfermedades infecciosas y cáncer. Al contrario que las células T convencionales que reconocen antígenos de péptido pequeño presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase 1 o el MHC de clase 2, las células NKT reconocen antígenos glucolípidicos presentados por CD1d, una molécula de tipo MHC de clase 1.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "iNKT" (células NKT invariantes) se refiere a un subgrupo mayor de células NKT, también denominado células NKT de tipo 1 que expresan un receptor de células T naturales (TCR) invariante compuesto de cadenas V[alfa] 14-J[alfa] 18 en ratones (V[alfa]24-J[alfa]18 en seres humanos). Tras la estimulación de TCR con un ligando, tal como alfa-galactosilceramida, las células iNKT producen rápidamente un amplio abanico de citocinas, incluyendo IL-4, IFN-[gamma], IL-12 y GM-CSF. Debe indicarse adicionalmente que las células iNKT comprenden dos subgrupos (o subpoblaciones) principales, es decir, células CD4+ y CD4-, que en seres humanos presentan perfiles de secreción de citocinas diferentes. Esta rápida y potente respuesta a un ligando permite que las células iNKT potencien o regulen la actividad de diversas células inmunológicas en la inmunidad innata o adquirida.

En una forma de realización, la aGVHD es una aGVHD de grado II-IV.

En una forma de realización, el donante candidato de trasplante humano es un donante hermano compatible (MSD) de HLA idéntico. En otra forma de realización, el donante candidato de trasplante humano es un donante no emparentado de HLA compatible (MUD). En todavía otra forma de realización, el donante candidato de trasplante humano es un donante no emparentado no compatible. El trasplante también puede ser de un donante haploidéntico o de sangre de cordón de compatibilidad HLA 4/6 a 6/6 (A, B, DR).

En una forma de realización, la subpoblación de células iNKT CD4- es una población de células CD3+ CD4-TCR V α 24V β 11.

La etapa (i) de expansión de la población de células iNKT puede llevarse a cabo mediante diferentes métodos, utilizando la estimulación no específica o específica de antígeno que es conocida por el experto en la materia. Típicamente, dicha expansión puede conseguirse mediante el cultivo de la población de células iNKT con un antígeno glicolípido (por ejemplo, alfa-galactosilceramida (alfa-GalCer)).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "expansión" se refiere al procedimiento de activar y amplificar una población dada de células (por ejemplo, células inmunológicas, tales como células T). La expansión de células T se lleva a cabo preferentemente mediante el cultivo de una población celular que comprende células T en presencia de un agente estimulante específico de células T y/o de antígeno o tal como antígenos, células, anticuerpos, lectinas, etc. La expansión puede requerir además el cultivo de células T en presencia de una citocina.

La etapa (ii) de detección de la presencia o ausencia de expansión de la subpoblación de células iNKT CD4- puede llevarse a cabo mediante una diversidad de métodos de detección de una población particular de células inmunológicas que se encuentran disponibles para el experto en la materia, incluyendo técnicas de inmunoselección, tales como la separación celular de alto rendimiento mediante métodos de citometría de flujo, métodos de afinidad con anticuerpos marcados en perlas magnéticas, perlas biodegradables, perlas no biodegradables y una combinación de dichos métodos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "métodos de citometría de flujo" se refiere a una técnica

de recuento de células de interés, mediante la suspensión de las mismas en un flujo de líquido y su paso por un aparato de detección electrónica. Los métodos de citometría de flujo permiten el análisis multiparamétrico simultáneo de los parámetros físicos y/o químicos de hasta miles de partículas por segundo, tal como parámetros fluorescentes. Los instrumentos modernos de citometría de flujo habitualmente presentan múltiples láseres y detectores de fluorescencia. Una variación común de las técnicas de citometría de flujo es la separación física de partículas basada en sus propiedades, de manera que se purifican o detectan poblaciones de interés, utilizando la “separación celular activada por fluorescencia”. Tal como se utiliza en la presente memoria, “separación celular activada por fluorescencia” (FACS) se refiere a un método de citometría de flujo para separar una mezcla heterogénea de células de una muestra biológica en dos o más recipientes, una célula cada vez, basándose en la dispersión luminica específica y características de fluorescencia de cada célula, y proporciona un registro rápido, objetivo y cuantitativo de las señales fluorescentes de células individuales, así como la separación física de las células de interés particular. De acuerdo con lo anterior, puede utilizarse FACS junto con los métodos indicados en la presente memoria para aislar y detectar la subpoblación de células iNKT CD4-.

Alternativamente, el aislamiento y detección de poblaciones de células inmunológicas (por ejemplo, células iNKT) puede llevarse a cabo utilizando métodos de separación basados en perlas, tales como perlas magnéticas.

Utilizando dichos métodos, pueden separarse las células y detectarse las positivas o negativas con respecto a los marcadores de superficie celular particulares.

Tal como se define en la presente memoria, “selección positiva” se refiere a técnicas que resultan en el aislamiento y detección de células que expresan marcadores de superficie celular específicos, mientras que “selección negativa” se refiere a técnicas que resultan en el aislamiento y detección de células que no expresan marcadores de superficie celular específicos. En algunas formas de realización, un experto en la materia podrá recubrir perlas con anticuerpos mediante técnicas estándares conocidas, tales como kits comerciales de conjugación de perlas. En algunas formas de realización, se lleva a cabo una etapa de selección negativa para eliminar las células que expresan uno o más marcadores de linaje, seguido de separación celular activada por fluorescencia para seleccionar y detectar positivamente un subgrupo de células iNKT (es decir, células iNKT CD4-).

En dichos métodos, las poblaciones de células inmunológicas pueden aislarse y detectarse con anticuerpos u otros agentes, tales como tetrámeros, específicamente mediante la unión a un marcador o antígeno de superficie celular.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un “agente de unión específica a un marcador de superficie celular” se refiere a un agente que puede reaccionar o unirse específicamente al marcador de superficie celular, pero presenta poca o ninguna reactividad detectable con otro marcador o antígeno de superficie celular o intracelular. Por ejemplo, un agente de unión específica a CD4 no se unirá a CD8. De esta manera, los agentes de unión específica a marcadores de superficie celular reconocen elementos estructurales únicos de dichos marcadores. En algunas formas de realización, un agente de unión específica a un marcador de superficie celular se une al marcador de superficie celular pero no causa el inicio de sucesos de señalización posteriores mediados por ese marcador de superficie celular, por ejemplo un anticuerpo no activador. Entre los agentes de unión específica a un marcador de superficie celular se incluyen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, ligandos naturales o recombinantes, moléculas pequeñas, secuencia de ácidos nucleicos y análogos de ácidos nucleicos, aptámeros y otras proteínas o péptidos.

En algunas formas de realización, los agentes preferentes son anticuerpos que se unen específicamente a los marcadores de superficie celular, y entre ellos pueden incluirse anticuerpos policlonales y monoclonales, y derivados de unión a antígeno o fragmentos de los mismos. Entre los fragmentos de unión a antígeno bien conocidos se incluyen, por ejemplo, anticuerpos de dominio único (dAb, que consisten esencialmente en dominios de anticuerpo VL o VH únicos), fragmentos Fv, incluyendo fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), fragmentos Fab y fragmentos F(ab')₂. Los métodos de construcción de dichas moléculas de anticuerpo son bien conocidos de la técnica. De acuerdo con lo anterior, tal como se utiliza en la presente memoria, el término “anticuerpo” se refiere a una inmunoglobulina intacta o a un fragmento de unión a antígeno monoclonal o policlonal con la región Fc (fragmento cristalizante) o fragmento de unión a FcRn de la región Fc. Pueden producirse fragmentos de unión a antígeno mediante técnicas de ADN recombinante o mediante el corte enzimático o químico de anticuerpos intactos. Entre los “fragmentos de unión a antígeno” se incluyen, entre otros, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAb, y fragmentos de región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de dominio único, anticuerpos quiméricos, diacuerpos y polipéptidos que contienen por lo menos una parte de una inmunoglobulina que resulta suficiente para proporcionar unión de antígeno específico al polipéptido. Los términos Fab, Fc, pFc', F(ab')₂ y Fv se utilizan con significados inmunológicos estándares (Roitt, I. (1991) *Essential Immunology*, 7ª ed., (Blackwell Scientific Publications, Oxford)). Dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se encuentran disponibles comercialmente de proveedores tales como R&D Systems, BD Biosciences, e-Biosciences, Proimmune y Miltenyi, o pueden generarse contra estos marcadores de superficie celular mediante métodos conocidos por el experto en la materia.

En algunas formas de realización, un agente que se une específicamente a un marcador de superficie celular, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, se marca con una etiqueta para facilitar el aislamiento y detección de las poblaciones de células inmunológicas o células iNKT.

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos “marcaje” o “etiqueta” se refieren a una composición capaz de producir una señal detectable indicativa de la presencia de una diana, tal como la presencia de un marcador de superficie celular específico en una muestra biológica. Entre los marcajes adecuados se incluyen moléculas fluorescentes, radioisótopos, cromóforos nucleótidos, enzimas, sustratos, fracciones quimioluminiscentes, partículas magnéticas y fracciones bioluminiscentes. De esta manera, un marcaje es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos necesarios para que los métodos aislen y detecten poblaciones de células inmunológicas o células iNKT. Entre los ejemplos de marcajes o etiquetas fluorescentes para el marcaje de los agentes, tales como anticuerpos para la utilización en los métodos de la invención, se incluyen hidroxycoumarina, éster de succinimidilo, aminocoumarina, éster de succinimidilo, metoxicoumarina, éster de succinimidilo, azul Cascade, hidrazida, azul Pacific, maleimida, naranja Pacific, amarillo Lucifer, NBD, NBD-X, R-ficoeritrina (PE), un conjugado PE-Cy5 (citocromo, R670, Tri-Color, rojo Quantum), un conjugado PE-Cy7, rojo 613, PE-rojo Texas, PerCP, proteína peridina-clorofila, TruRed (conjugado PerCP-Cy5.5), FluorX, isotiocianato de fluoresceína (FITC), BODIPY-FL, TRITC, rodamina-X (XRITC), lisamina rodamina B, rojo Texas, alofocianina (APC), un conjugado APC-Cy7, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 750, Alexa Fluor 790, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 o Cy7.

En una forma de realización particular, la población de células CD3+ CD4-TCR V α 24V β 11 puede detectarse mediante la utilización de un agente marcado de unión específica a CD4 (por ejemplo, un anticuerpo marcado de unión específica a CD4), un agente marcado de unión específica a CD3 (por ejemplo, un anticuerpo marcado de unión específica a CD3) y un agente marcado de unión específica a TCR V α 24V β 11 restringido a CD1d de células iNKT (por ejemplo, un tetrámero de CD1d humano precargado con glicolípido, tal como el tetrámero CD1d/PBS-57 o los adquiridos de ProlImmune).

En una forma de realización, la etapa i) de expansión de la población de células iNKT se lleva a cabo mediante (a) aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de la muestra biológica obtenida de dicho donante candidato de trasplante humano, y (b) cultivo de dichas PBMC en un medio que comprende tanto un agente estimulante de la proliferación de células iNKT como un agente activador de células iNKT.

La etapa (a) de aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de la muestra biológica obtenida de dicho donante candidato de trasplante humano puede llevarse a cabo mediante métodos bien conocidos por el experto en la materia (por ejemplo, mediante centrifugación de densidad, tal como la centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-PaqueTM).

La etapa (b) de cultivo de PBMC en un medio que comprende tanto un agente estimulante de la proliferación de las células iNKT como un agente activador de las células iNKT se lleva a cabo durante el tiempo necesario para la expansión de las células iNKT.

Típicamente, el cultivo de las PBMC con un medio de interés se llevará a cabo durante por lo menos 10 días, preferentemente por lo menos 12 días, todavía más preferentemente por lo menos 15 días.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “medio” se refiere a un medio para mantener una población celular o cultivar una población celular (por ejemplo, un “medio de cultivo”) que contiene nutrientes que mantienen la viabilidad celular y permiten la proliferación. El medio puede contener cualquiera de los siguientes en una combinación apropiada: una o más sales, uno o más tampones, aminoácidos, glucosa u otros azúcares, antibióticos, suero o sustitutivo de suero, y otros componentes, tales como factores de crecimiento, citocinas, etc. Los medios utilizados ordinariamente para tipos celulares particulares son conocidos por el experto en la materia. El medio de la invención puede estar basado en un medio disponible comercialmente, tal como RPMI1640 de Invitrogen.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “agente estimulante de la proliferación de células iNKT” se refiere a cualquier compuesto, natural o sintético, que puede incrementar el crecimiento de las células iNKT.

Ventajosamente, el agente estimulante de la proliferación de células iNKT se selecciona del grupo que consiste en IL-2, IL-7 e IL-15.

En una forma de realización particular, el agente estimulante de la proliferación de células iNKT es IL-2. Preferentemente, IL-2 es una interleucina-2 humana recombinante (rhIL-2). Además, rhIL-2 debe encontrarse

disponible comercialmente para el uso farmacéutico. Entre las formas comerciales adecuadas se incluyen, por ejemplo, Proleukin®, una composición de IL-2 humana recombinante.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “agente activador de células iNKT” se refiere a cualquier compuesto, natural o sintético, que puede unirse a CD1d y activar el receptor de células T (TCR) natural invariante, conduciendo a una producción intensa de citocinas Th1 (por ejemplo, IFN- γ) y/o citocinas Th2 (por ejemplo, IL-4) que, a su vez, amplifiquen o regulen las respuestas inmunológicas innatas/adaptativas mediante la inducción de la maduración de las células dendríticas (DC) y mediante su influencia sobre funciones de otras células inmunológicas, tales como células NK, macrófagos y linfocitos T convencionales.

Ventajosamente, el agente activador de células iNKT es un antígeno glucolípido, en particular un antígeno glucoesfingolípido, tal como alfa-galactosilceramida (alfa-GalCer) y análogos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “alfa-galactosilceramida” (alfa-GalCer) o (2S,3S,4R)-1-O-(alfa-D-galactosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3,4-octadecanotriol) también denominado KR7000), se refiere a un glucoesfingolípido derivado de esponja marina, que es un antígeno superagonista para las células iNKT (descrito en la patente US nº 5.936.076).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “análogos alfa-GalCer” se refiere a cualquier compuesto, natural o sintético, que conduce a la misma producción de citocinas que alfa-GalCer. De esta manera, entre dichos compuestos se incluyen derivados de alfa-GalCer, así como compuestos cuya estructura es similar a alfa-GalCer y son bien conocidos por el experto en la materia. Se han descrito otros análogos, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacional WO 93/05055, WO 94/09020, WO 94/24142, WO 94/02168 y WO 98/44928.

En una forma de realización, el agente activador de las células iNKT es un antígeno glucolípido seleccionado del grupo que consiste en alfa-galactosilceramida (alfa-GalCer), alfa-glucuronosilceramida, fosfatidilinositol-tetramanósido, isoglobotrihexosilceramida, gangliósido GD3, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, sulfátido, beta-galactosilceramida, lipofosfoglicano, fosfolípido glicoinositol, análogos de alfa-galactosilceramida, incluyendo galactoceramida beta-anomérica y galactosilceramida alfa-anomérica y antígenos lipídicos bacterianos.

En una forma de realización particular, el agente activador de las células iNKT es alfa-GalCer.

Típicamente, se añade alfa-GalCer al medio de cultivo de la invención a una concentración comprendida entre 1 y 500 ng/ml, preferentemente de 100 ng/ml.

Típicamente, se añade IL-2 al medio de cultivo de la invención a una concentración comprendida entre 1 y 100 ng/ml, preferentemente de 50 ng/ml.

En una realización preferente, se añadió alfa-GalCer al medio de cultivo de la invención el día 0 y después se añadió IL-2 al medio de cultivo el día 1.

Métodos para seleccionar un donante de trasplante humano

La invención proporciona además métodos para seleccionar un donante de trasplante. La información obtenida mediante los métodos descritos anteriormente puede utilizarse para seleccionar un donante de trasplante de entre varios donantes compatibles previamente identificados con el fin de evitar o minimizar el desarrollo de GVHD aguda.

De esta manera, en un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para seleccionar un donante de trasplante humano con el fin de reducir el riesgo de inducir GVHD aguda en un receptor de trasplante humano, que comprende las etapas siguientes: (i) llevar a cabo el método para determinar el riesgo según la reivindicación 1, e (ii) seleccionar dicho donante de acuerdo con dicha determinación de riesgo.

Los métodos pueden llevarse a cabo mediante la utilización, por ejemplo, de cualquiera de los métodos de determinación de riesgo descritos anteriormente y, en consideración de los resultados obtenidos, seleccionar el mejor donante de trasplante para el receptor de trasplante con el fin de reducir el riesgo de GVHD aguda. En el caso de que el nivel de expansión de la subpoblación de células iNKT CD4- indique que el donante presenta un riesgo de inducir GVHD, puede resultar necesario identificar otro donante compatible.

En efecto, para limitar los riesgos de rechazo de las células troncales trasplantadas o de GVHD aguda en el HSCT, el donante preferentemente debería presentar los mismos antígenos leucocitarios humanos (HLA) que el receptor. Se encuentra un donante compatible mediante la realización de ensayos de HLA adicionales en la sangre de los donantes potenciales. Los genes HLA se clasifican en dos categorías (tipo I y tipo II). En general, las incompatibilidades de los genes de tipo I (es decir, HLA-A, HLA-B o HLA-C) incrementan el riesgo de rechazo

del trasplante. Una incompatibilidad de un gen HLA de tipo II (es decir, HLA-DR o HLA-DQB1) incrementa el riesgo de la enfermedad de injerto contra el hospedador. La búsqueda de compatibilidad se realiza basándose en la variabilidad en tres o más loci del gen HLA y resulta preferente una compatibilidad perfecta en estos loci. Aunque exista una buena compatibilidad en estos alelos críticos, el receptor requerirá medicación inmunosupresora para mitigar la enfermedad de injerto contra el hospedador. Los donantes de trasplante alogénicos pueden estar emparentados (habitualmente un hermano de HLA estrechamente compatible o MSD) o no emparentado (donante que no está emparentado y que se encuentra que presenta un grado muy elevado de compatibilidad de HLA, o MUD). Pueden encontrarse donantes no emparentados mediante un registro de donantes de médula ósea, tal como el Programa Internacional de Donantes de médula ósea.

Métodos para el ajuste del tratamiento inmunosupresor

La invención proporciona además métodos para desarrollar planes de tratamiento personalizados. La información obtenida mediante los métodos descritos anteriormente puede utilizarse para desarrollar un plan de tratamiento personalizado para un receptor de trasplante.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para ajustar el tratamiento inmunosupresor administrado en un receptor trasplantado humano tras su trasplante de injerto, que comprende las etapas siguientes: (i) llevar a cabo los métodos para determinar el riesgo según la invención, e (ii) ajustar el tratamiento inmunosupresor.

Los métodos pueden llevarse a cabo mediante, por ejemplo, la utilización de cualquiera de los métodos para determinar el riesgo indicado anteriormente y, en consideración de los resultados obtenidos, el diseño de un plan de tratamiento para el receptor trasplantado. En el caso de que el nivel de expansión de la subpoblación de células iNKT CD4⁻ indique que el receptor está en riesgo de un resultado clínico no deseable (por ejemplo, el desarrollo de aGVHD), el receptor será un candidato para el tratamiento con una cantidad eficaz de un tratamiento inmunosupresor (por ejemplo, con un agente antirrechazo). Dependiendo del nivel de expansión de la subpoblación de células iNKT CD4⁻ (es decir, la presencia o ausencia de expansión de la subpoblación en la muestra biológica analizada), el receptor puede requerir un régimen de tratamiento que resulta más o menos agresivo que el régimen estándar, o puede determinarse que el receptor resulta más adecuado para un régimen estándar. En el caso de que se trate de esta manera, pueden tratarse o prevenirse las complicaciones asociadas con el trasplante, tales como la aGVHD. A la inversa, el nivel de expansión de la subpoblación de células iNKT CD4⁻ puede indicar que el paciente no es probable que experimente un resultado clínico no deseable. En ese caso, el paciente puede evitar un tratamiento inmunosupresor (o requerir un régimen menos agresivo) y sus efectos secundarios asociados.

Puede utilizarse según la invención cualquier agente inmunosupresor utilizado en el trasplante a fin de controlar el rechazo, o una combinación de dichos agentes, tal como prednisona, metilprednisolona, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, anticuerpos monoclonales contra las células T, por ejemplo, OKT3, y antiseros de linfocitos humanos (globulina antilinfocito-ALS) o de células tímicas (globulina antitímocito-ATG). Son ejemplos de agentes mieloablativos que pueden utilizarse según la invención, busulfán, dimetilmilerán y tiotepa.

Kits descritos en la solicitud

Un kit adecuado para llevar a cabo los métodos según la invención. Dicho kit puede comprender por lo menos: a) un agente estimulante de la proliferación de las células iNKT, b) un agente activador de las células iNKT y c) un agente marcado de unión específica a CD4, tal como se ha indicado anteriormente.

El kit comprende por lo menos IL-2 alfa-GalCer y un anticuerpo marcado de unión específica a CD4.

El kit comprende, además: d) un agente marcado de unión específica a CD3 (por ejemplo, un anticuerpo marcado de unión específica a CD3) y e) un agente marcado de unión específica a TCR V α 24V β 11 restringido a CD1d de las células iNKT (por ejemplo, tetrámero de CD1d humano precargado, tal como un tetrámero de CD1d/PBS-57 o los adquiridos de Prolimmune).

El kit puede comprender además uno o más reactivos bioquímicos útiles para llevar a cabo el método según la invención (por ejemplo, una solución tampón, tal como PBS y un tampón de lavado).

La invención se ilustra adicionalmente mediante las figuras y ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse en modo alguno como limitativos del alcance de la presente invención.

Figuras

Figura 1: perfil de FACS representativo de (A) células iNKT totales teñidas con un anti-CD3 y un tetrámero de CD1d cargado con PBS57 (izquierda) o un tetrámero de CD1d vacío utilizado como control negativo (derecha) y (B) el perfil de expresión de CD4 de células iNKT seleccionadas.

Figura 2: representación de los resultados de la expansión de la población de células iNKT CD4- procedentes de injertos de donantes. (A) Se encuentra presente la subpoblación de células iNKT CD4- y se ha expandido en cultivo a partir de la población de iNKT o (B) la subpoblación de células iNKT CD4- se encuentra ausente y/o no se ha expandido en cultivo a partir de la población de iNKT.

Figura 3: análisis de ROC que predice el riesgo de aGVHD de grado II-IV. (A): valor predictivo de la proporción iNKT CD4-/T del injerto, (B) y (C): valor predictivo del factor de expansión de las células iNKT CD4- del injerto.

Figura 4: comparación de las células iNKT CD4-/pocillo el día 0 (A) y el día 15 (B) del cultivo de injertos de PBSC procedentes de pacientes que habían desarrollado aGVHD de grado 0-1 frente a pacientes que habían desarrollado aGVHD de grado II-IV.

Ejemplos

Análisis del contenido de injerto y la capacidad de expansión de las células iNKT CD4- del injerto o de sangre periférica de donantes de HSCT en relación a la aparición de GVHD aguda en el receptor después del trasplante.

Materiales y métodos

Expansión de células iNKT: se cultivaron las PBMC de los donantes de muestras de sangre o médula ósea en placas de 24 pocillos a una densidad de 10^6 células por pocillo en medio RPMI 1640 que contenía 100 U/ml de antibióticos (penicilina + estreptomina), FBS al 10%, glutamina 2 mM y HEPES 10 mM. Se añadieron 100 ng/ml de alfa-galactosilceramida (KRN7000) al inicio del cultivo, seguido, 24 h después, de 50 ng/ml (u 845 UI/ml) de rhIL-2. Tras 2 semanas, se recogieron células, se lavaron extensivamente, y se sometieron a ensayo para su viabilidad mediante exclusión de azul tripán.

Tinción superficial: se analizaron las PBMC de donantes frescas o en cultivo mediante citometría de flujo. La tinción de las PBMC se llevó a cabo a 4°C durante 30 min en presencia de los anticuerpos monoclonales directamente conjugados con fluoresceína siguientes: tetrámero de CD1d humano precargado con alfa-GalCer (de ProImmune), anti-CD3 humano y anti-CD4 humano (de eBioscience). Las células se resuspendieron en PBS IX más FBS al 2% y en primer lugar se tiñeron con dicho tetrámero de CD1d humano precargado con alfa-GalCer, se lavaron con PBS IX, FBS al 2% y después se tiñeron con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4. Las células se captaron en un FACSCanto II (BD Biosciences) y se analizaron utilizando el software FlowJo (Tree Star).

Pacientes y métodos: los inventores han analizado el contenido de injertos de HSCT en subtipos de células T, incluyendo células iNKT procedentes de 54 donantes alogénicos (52% de emparentados compatibles y 48% de no emparentados compatibles) y pudieron explorar la capacidad de expansión de las células iNKT en 34 de ellos (14 de células troncales de médula ósea y 21 de PBSC). Se analizaron mediante citometría de flujo las proporciones de contenidos de los injertos y los números absolutos de células T totales, CD4- y CD4+, iNKT, CD4+, CD8+, $\gamma\delta$ + y células T no sensibilizadas y reguladoras activadas de memoria. Se analizó la capacidad de expansión de las subpoblaciones de células iNKT CD4+ y CD4- tras 15 días de cultivo de PBMC con IL-2 y alfa-GalCer.

Los resultados se correlacionaron con el desarrollo de aGVHD de grados II a IV en los receptores tras HSCT alogénica, que se produjo en 15 de los 54 pacientes (28%) y de 6 de los 21 injertos de PBSC (28.5%) que pudieron explorarse para la capacidad de expansión de los subtipos de iNKT.

Resultados

Tal como se muestra en la figura 1, la población de células iNKT totales puede detectarse mediante citometría de flujo en las células CD3+ y positivas para tetrámero de CD1 (figura 1A). Se detectaron las subpoblaciones de iNKT CD4- y CD4+ mediante la utilización de un anticuerpo marcado anti-CD4 (figura 1B).

Tal como se muestra en la figura 2, tras 12 a 15 días de expansión in vitro de las células iNKT en presencia de IL-2 y alfa-Gal-Cer, se observaron dos situaciones diferentes según la expansión (2A) o no (2B) de la subpoblación de células iNKT CD4-.

En el análisis univariante (Tabla 1), entre los diferentes subgrupos de linfocitos explorados y los análisis funcionales, sólo las proporciones de iNKT totales/T, iNKT CD4-/T y la capacidad de expansión de las células iNKT CD4- se observó que estaban significativamente asociadas a la incidencia de aGVHD de grado II-IV ($p=0.039$, $p=0.038$ y $p=0.008$, respectivamente). De esta manera, tal como se ha informado anteriormente, en comparación con los pacientes que desarrollaron aGVHD de grado II-IV, los pacientes que desarrollaron aGVHD

de grado 0-1 habían recibido un injerto que contenía proporciones más elevadas de células iNKT CD4-.

Tabla 1: análisis univariante de las correlaciones entre el contenido del injerto de subgrupos de células T y la aparición de aGVHD de grado II-IV

Variable	aGVHD de grado II-V media (SD)		valor de p
	sí	no	
CD34+ x 10 ⁶ /kg	4.2 (2.7)	4 (2.1)	0.9
T CD3+ x 10 ⁶ /kg	29.9 (16.6)	26.3 (14.6)	0.44
iNKT totales x 10 ⁶ /kg	0.16 (0.32)	0.18 (0.23)	0.29
iNKT CD4+ x 10 ⁶ /kg	0.04 (0.08)	0.07 (0.15)	0.26
iNKT CD4- x 10 ⁶ /kg	0.12 (0.27)	0.14 (0.19)	0.26
LTCD4+ x 10 ⁶ /kg	86.1 (83.6)	76.3 (88)	0.5
LTCD8+ x 10 ⁶ /kg	54.9 (55.1)	56.3 (71.3)	0.96
LTCD3 γδ+ x 10 ⁶ /kg	12.8 (14.4)	13.7 (19.3)	0.5
células T reg. totales x10⁶/kg	1.2 (1.7)	1.5 (2.1)	0.59
INKT totales / 10 ³ T	1.1 (1.3)	1.9 (1.8)	0.039
INKT CD4+ / 10³T	0.3 (0.4)	0.5 (0.7)	0.13
INKT CD4+ / 10 ³ T	0.7 (0.9)	1.3 (1.5)	0.038
LTCD4+ / 10 ³ T	580.6 (112.9)	567 (109.6)	0.68
LTCD8+ / 10 ³ T	375.5 (90.2)	390.7 (88.2)	0.57
células T reg. totales / 10 ³ T	6.7 (4.5)	9.9 (9.1)	0.54
LTCD3 γδ+ / 10 ³ T	123.9 (82.3)	129.4 (104.1)	0.91
Factor de expansión de iNKT CD4+	260.5 (317.9)	287.8 (633.4)	0.77
Factor de expansión de iNKT CD4-	15.7 (30.6)	35.3 (43.0)	0.008

En el análisis multivariante (Tabla 2), la capacidad de expansión de las células iNKT CD4- contenidas en el injerto era un factor predictivo independiente de la incidencia de aGVHD de grado II-IV (cociente de probabilidades=0.19, IC al 95%: 0.029-0.55, p=0.017), así como la utilización de un donante no emparentado (p=0.028).

Tabla 2: análisis multivariante del impacto de las características del trasplante sobre la incidencia de aGVHD de grado II-IV

	Cociente de probabilidades	[IC al 95%]	valor de p
Factor de expansión de las células iNKT CD4-	0.19	[0.029-0.55]	0.017
Edad del receptor	0.88	[0.67-1.01]	0.18
Edad del donante	1.13	[0.99-1.4]	0.14
DEC versus MUD	6.6×10 ⁻⁴	[1.1×10 ⁻⁸ -7.6×10 ⁻²]	0.028

Utilizando análisis de ROC (figura 3), los inventores encontraron que el factor de expansión de las células iNKT CD4- contenidas en el injerto era el mejor factor predictivo de la incidencia de aGVHD de grado II-IV (superficie bajo la curva (AUC)=0.76). Todos los injertos incluidos, la sensibilidad del ensayo fue de 96% (probabilidad de desarrollar aGVHD con un factor de expansión inferior a 1.8) y especificidad de 70% (probabilidad de no desarrollar aGVHD superior al valor de corte). En injertos de PBSC (n=21 con 6 aGVHD de grado II-IV), la predictividad del ensayo fue incluso mejor con un AUC=1 y una sensibilidad y especificidad de 100% (figuras 3 y 4).

En 15 donantes, los inventores observaron patrones similares de capacidad de expansión de las células iNKT CD4- de sangre periférica antes de la movilización por G-CSF o el injerto (Tabla 3).

Tabla 3: comparación entre la capacidad de expansión de las células iNKT CD4- de muestras de injerto o de sangre periférica en 12 donantes de PBSC y 3 de BMC.

Nº de donante	Tipo de injerto	Capacidad de expansión de células iNKT CD4- de	
		Injerto de HSC	Sangre periférica
1	PBSC	+	+
2	PBSC	+	+
3	PBSC	+	+
4	PBSC	-	-
5	PBSC	+	+
6	PBSC	+	+
7	PBSC	+	+
8	PBSC	+	+

Nº de donante	Tipo de injerto	Capacidad de expansión de células iNKT CD4- de	
		Injerto de HSC	Sangre periférica
9	PBSC	+	+
10	PBSC	+	+
11	PBSC	+	+
12	PBSC	+	+
13	BMC	+	+
14	BMC	+	+
15	BMC	+	+

Referencias:

Durante la totalidad de la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que se refiere la presente invención.

Chaidos A, Patterson S, Szydlo R, Chaudhry MS, Dazzi F, Kanfer E, McDonald D, Marin D, Milojkovic D, Pavlu J, Davis J, Rahemtulla A, Rezvani K, Goldman J, Roberts I, Apperley J, Karadimitris A; Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; Blood 119(21):5030-6, 24 de mayo, 2012.

Rubio MT, Moreira-Teixeira L, Bachy E, Bouillie M, Milpied P, Coman T, Suarez F, Marcais A, Sibon D, Buzyn A, Caillat-Zucman S, Cavazzana-Calvo M, Varet B, Dy M, Hermine O, Leite-de-Moraes M. Early posttransplantation donor-derived invariant natural killer T-cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival. Blood. 120(10):2144-54, 6 de sept., 2012.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar si un donante de trasplante humano candidato está en riesgo de inducir una enfermedad aguda de injerto contra el hospedador (aGVHD) en un receptor de trasplante humano, que comprende las etapas siguientes de: i) expandir la población de células NKT invariantes (iNKT) de una muestra biológica obtenida a partir del donante de trasplante humano candidato, ii) detectar la presencia o ausencia de expansión de la subpoblación de células iNKT CD4⁻ en la población obtenida en la etapa i); e iii) concluir que el donante de trasplante humano candidato presenta un riesgo aumentado de inducir aGVHD en un receptor de trasplante humano cuando la subpoblación de células iNKT CD4⁻ no se expande a partir de la población de células iNKT.
2. Método para seleccionar un donante de trasplante humano para reducir el riesgo de inducir aGVHD en un receptor de trasplante humano, que comprende las etapas siguientes de (i) llevar a cabo el método para determinar el riesgo según la reivindicación 1, e (ii) seleccionar dicho donante de acuerdo con dicha determinación de riesgo.
3. Método para ajustar el tratamiento inmunosupresor administrado a un receptor trasplantado humano tras su trasplante de injerto, que comprende las etapas siguientes de (i) llevar a cabo el método para determinar el riesgo según la reivindicación 1, e (ii) ajustar el tratamiento inmunosupresor.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa i) de expandir la población de células iNKT se lleva a cabo (a) aislando las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la muestra biológica obtenida a partir de dicho donante de trasplante humano candidato, y (b) cultivando dichas PBMC en un medio que comprende tanto un agente que estimula la proliferación de células iNKT como un agente que activa las células iNKT.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la subpoblación de células iNKT CD4⁻ es una población de células CD3⁺ CD4⁻ TCR V α 24V β 11.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en el que el agente que estimula la proliferación de las células iNKT es la interleucina 2 (IL-2).
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el agente que activa las células iNKT es un antígeno glucolípido seleccionado de entre el grupo que consiste en alfa-galactosilceramida (alfa-GalCer), alfa-glucuronosilceramida, fosfatidilinositol tetramanósido, isoglobotrihexosilceramida, gangliósido GD3, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, sulfátido, beta-galactosilceramida, lipofosfoglicano, fosfolípido glicoinositol, análogos de alfa-galactosilceramida que incluyen galactoceramida beta-anomérica, galactosilceramida alfa-anomérica y antígenos lipídicos bacterianos.
8. Método según la reivindicación 7, en el que el antígeno glucolípido es la alfa-GalCer.

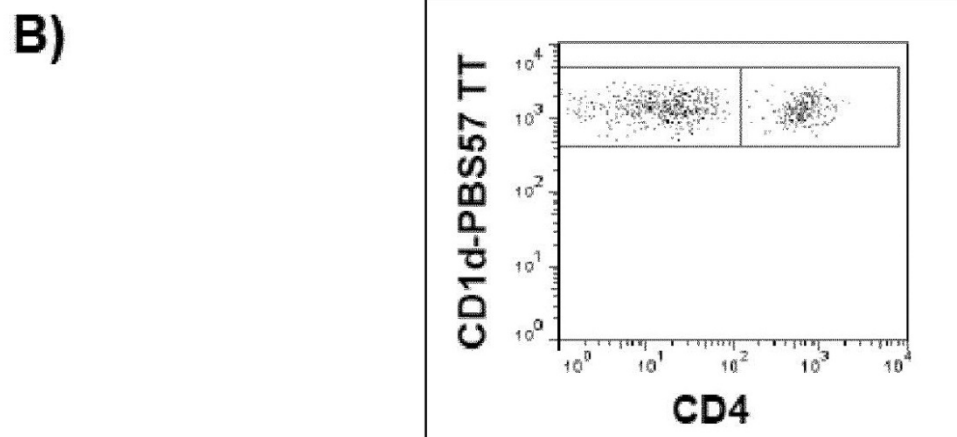
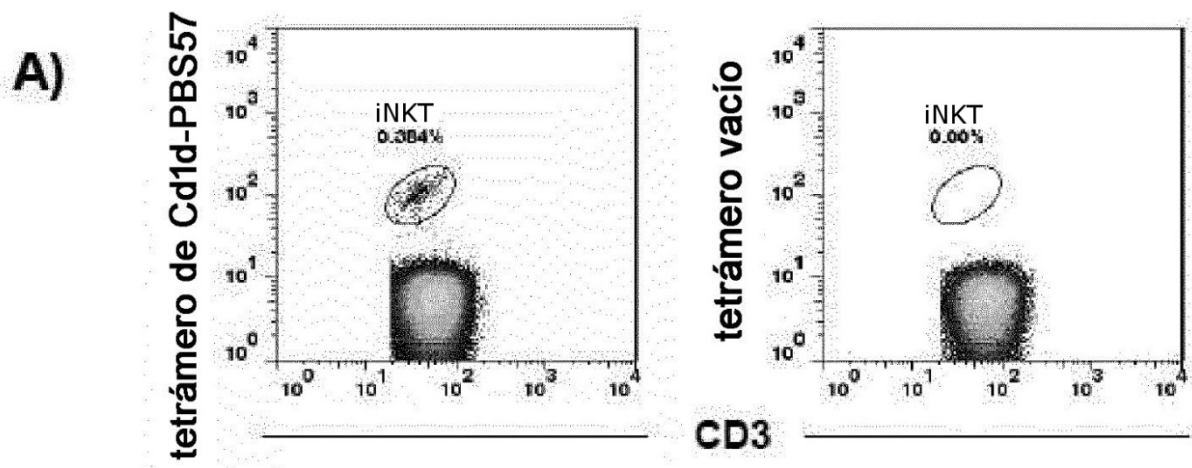


Figura 1

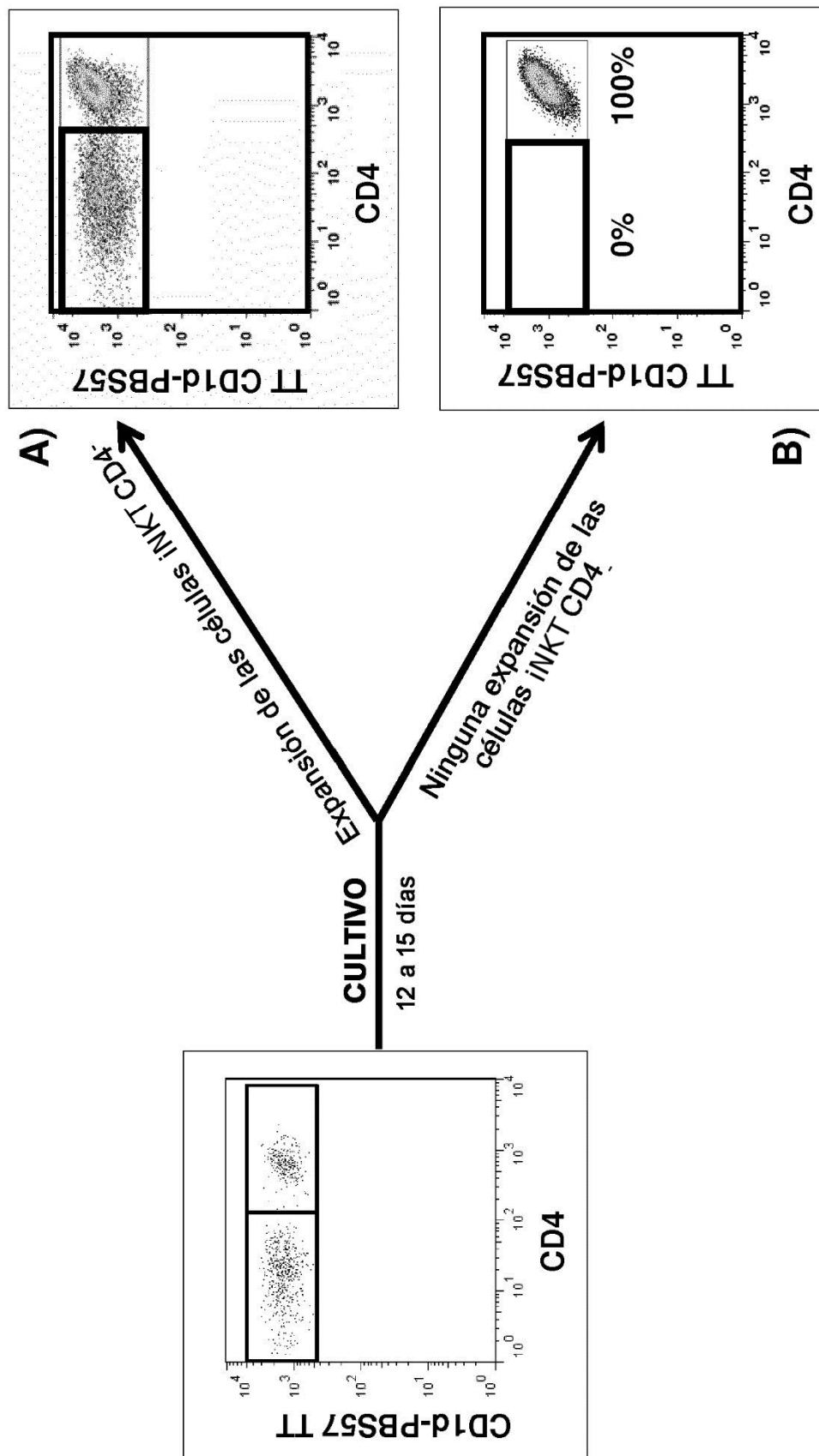


Figura 2

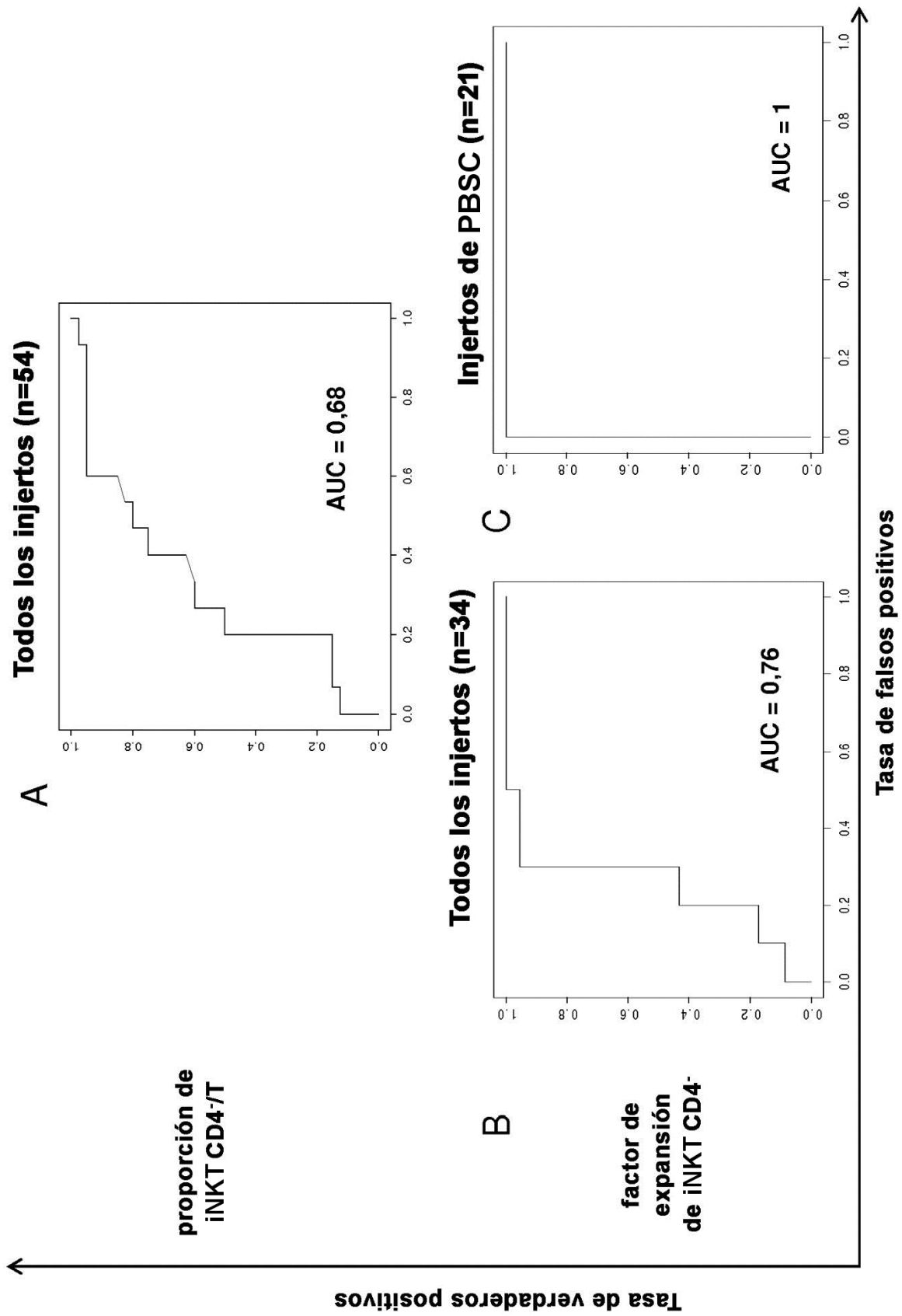


Figura 3

iNKT CD4⁺ / pocillo

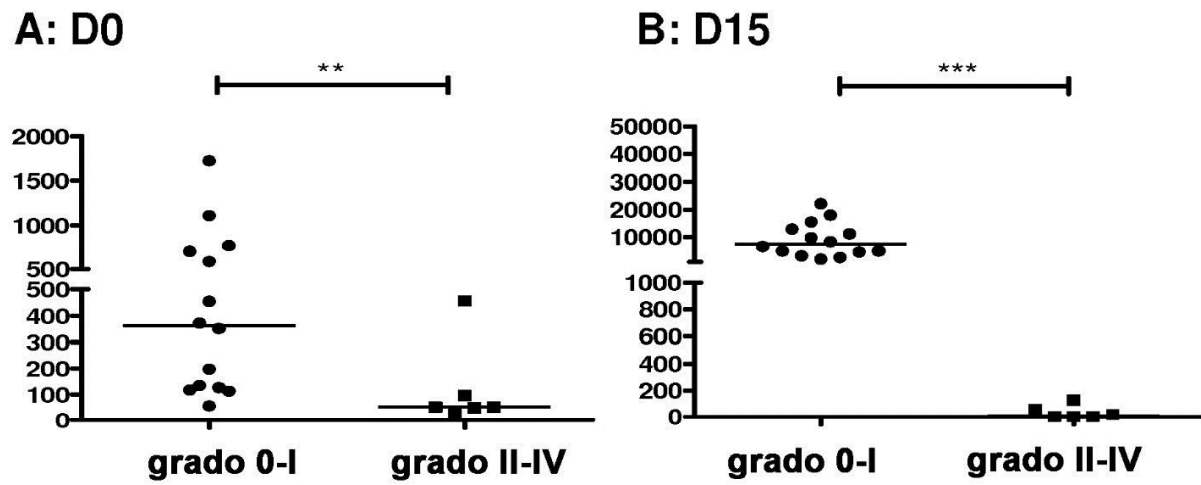


Figura 4