



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 491**

51 Int. Cl.:

G01N 1/34 (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07824054 .6**

96 Fecha de presentación : **05.10.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2084508**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.08.2009**

54 Título: **Procedimiento de preparación.**

30 Prioridad: **06.10.2006 GB 0619853**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.10.2011

73 Titular/es: **OXFORD IMMUNOTEC LIMITED**
94C Milton Park
Abingdon, Oxfordshire OX14 4RY, GB

72 Inventor/es: **Durrant, Ian;**
Day, Toni;
O'Keeffe, Aisling y
Bampton, Maxine

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 366 491 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

Procedimiento de preparación

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los procedimientos para el almacenamiento y purificación de las células de una muestra de sangre completa. En particular, la invención se refiere a los procedimientos para el almacenamiento y purificación de las células de las muestras de sangre completa, de tal manera que una población de linfocitos y células presentadoras de antígeno se estabiliza y purifica eficazmente para su utilización en ensayos que miden la respuesta inmunitaria *in vitro* mediada por células.

10 **Antecedentes de la invención**

Las respuestas inmunitarias mediadas por células (IMC) se utilizan normalmente para definir el estado inmunitario de un individuo. Por lo general, en la técnica de la inmunología clínica, el término respuesta IMC incluye pruebas cutáneas *in vivo*, ensayos de proliferación de linfocitos y la detección *in vitro* de citocinas producidas por las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) en presencia de un antígeno específico. La invención descrita en este documento estudia procedimientos mejorados de manipulación, estabilización y preparación de las células procedentes de muestras aisladas de sangre completa para su utilización en técnicas de ensayo diseñadas para medir una clase de respuestas IMC, a saber, la respuesta IMC *in vitro* basada en citocinas a un antígeno específico (denominado en adelante "ensayo IMC").

Las células del sistema inmunológico son capaces de producir moléculas efectoras inmunitarias como las citocinas tras la estimulación por un antígeno. Los ensayos IMC implican la incubación de una muestra de células con un antígeno y la medición de la presencia o cantidad de una molécula efectoras inmunes, tales como una citocina para proporcionar una indicación de la capacidad del individuo para generar una respuesta inmunitaria mediada por células con el antígeno seleccionado. Células para su utilización en un ensayo IMC también incluyen poblaciones aisladas de linfocitos (linfocitos T en concreto) y células presentadoras de antígeno (CPA). Las CPA están involucradas en el tratamiento del antígeno a fin de que estos últimos pueden ser reconocidos por los receptores de linfocitos T en la superficie de cada linfocito T. Citocinas inducidas por antígenos pueden ser liberadas en el medio de ensayo y detectarse de manera directa, por ejemplo, por los procedimientos de ELISA, o cuantificarse en términos de la frecuencia de linfocitos T secretores de citocinas utilizando procedimientos ELISPOT.

El ensayo en filtro inmunoplaaca, denominado también ensayo inmunomancha con enzima ligada (ELISPOT), fue desarrollado inicialmente para detectar y cuantificar linfocitos B secretores de anticuerpos. Por el momento se desarrolló, la técnica proporcionó una alternativa rápida y versátil a los ensayos convencionales con células formadoras de placas. Modificaciones recientes han mejorado la sensibilidad de la ELISPOT de tal manera que pueden detectarse células productoras de tan sólo 100 moléculas de una proteína específica por segundo. Estos ensayos se aprovechan de la concentración relativamente alta de un producto celular proteico dado (por ejemplo, una citocina) en el entorno inmediato que rodea las células secretoras de proteínas. Estos productos celulares son capturados y detectados utilizando anticuerpos de alta afinidad. El ensayo ELISPOT se revisa en Current Protocols in Immunology, Unidad 6.19 páginas 6.19 1-8.

El ensayo ELISPOT por lo general involucra seis etapas: (1) recubrimiento de un anticuerpo específico para una citocina purificada a una placa de microvaloración respaldada con membrana; (2) bloqueo de la placa para evitar la absorción inespecífica de otras proteínas; (3) incubación de las células secretoras de citocinas con reactivos apropiados; (4) eliminación de células y reactivos, (5) adición de un segundo anticuerpo anticitocina marcado, y (6) detección del complejo anticuerpo-citocina en la membrana.

Los procedimientos actuales para preparar células a partir de una muestra de sangre para su utilización en un ensayo IMC implican el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), utilizando un gradiente de Ficoll. De acuerdo con estos procedimientos, con el fin de ser eficaces en el ensayo IMC, los linfocitos y las CPA deben purificarse en la muestra de sangre completa tan pronto como sea posible, y en particular dentro de las 8 horas de la recogida de la muestra de sangre de un individuo.

55 Meier et al., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2005: 529-536 expone la sensibilidad del ensayo ELSPOT para el diagnóstico de la tuberculosis. Peters et al. *Methods in Molecular Biology*, vol. 302, 2005, Handbook of ELISPOT: Methods and Protocols, págs. 95-115 expone los procedimientos para el aislamiento de subconjuntos de inmunocitos para análisis utilizando ensayos ELISPOT. El documento US 2003/0185817 da a conocer procedimientos de separación de células utilizando inmunorrosetas de células nucleadas y de glóbulos rojos.

60 **Sumario de la invención**

Los presentes inventores han identificado los procedimientos de almacenamiento y purificación de las células de una muestra de sangre completa para su utilización en inmunoanálisis mediados por células (ensayos IMC), tal como un ensayo ELISPOT. También se identifican los procedimientos para el tratamiento de muestras de sangre completa antes de su almacenamiento. Estos procedimientos permiten almacenar muestras de sangre completa durante, por

ejemplo, por lo menos 6 horas, tal como hasta 48 horas antes de su utilización en un ensayo IMC, tal como un ensayo ELISPOT.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento de realización de un inmunoanálisis *in vitro* mediado por células que comprende:

- (I) almacenar una muestra de sangre completa extraída de un individuo durante al menos 6 horas *in vitro*,
- (II) purificar una población de células que contienen linfocitos T y células presentadoras de antígenos (CPA) de granulocitos que están presentes en dicha muestra almacenada, mediante un procedimiento que incorpora una etapa de selección por afinidad negativa para eliminar granulocitos o una etapa de selección por afinidad positiva utilizando ligandos que se unen a proteínas de la superficie celular presentes en la superficie de linfocitos T y de las CPA unidas a un soporte sólido para separar dicha población de granulocitos; y
- (III) utilizar dicha población de células en un inmunoanálisis mediado por células, para medir las repuestas de la citocina específica para el antígeno en linfocitos T.

un procedimiento de tratamiento y almacenamiento de una muestra de sangre completa que comprende el tratamiento de dicha muestra de sangre completa por dilución con el medio de crecimiento; y el almacenamiento de la muestra de sangre completa tratada de al menos 6 horas, en la que después del almacenamiento una población de linfocitos y CPA pueden obtenerse de la muestra para su utilización en un ensayo IMC. Después del almacenamiento, las CMSP o una preparación adecuada de los linfocitos y las CPA pueden aislarse de la muestra de sangre completa diluida para su utilización en un ensayo IMC, tal como un ensayo ELISPOT.

Los inventores describen además un procedimiento para mantener la respuesta de los linfocitos T aislados a citocinas específicas para péptidos procedentes de una muestra de sangre completa en un ensayo ELISPOT, que comprende la separación de una población de células que comprenden linfocitos T y las CPA de dicha muestra de sangre completa utilizando una selección por afinidad positiva o negativa.

Los inventores describen además un procedimiento de preparación de linfocitos y las CPA adecuadas para su utilización en un ensayo ELISPOT, en el que dicho procedimiento comprende la eliminación de los glóbulos rojos de la sangre por filtración.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para almacenar y purificar las células de una muestra de sangre completa para su utilización en un ensayo IMC como un ensayo ELISPOT. Los inventores describen también un procedimiento de tratamiento de una muestra de sangre completa por dilución con un medio de crecimiento de las células y el almacenamiento de la muestra de sangre completa tratada. Los procedimientos permiten que la respuesta a las citocinas específicas para péptidos de los linfocitos aislados y de las CPA de dicha muestra de sangre sea suficiente para su utilización en un ensayo IMC, tal como un ensayo ELISPOT, y preferentemente que sea útil en un procedimiento de diagnóstico.

De conformidad con la presente invención, un inmunoanálisis mediado por células (ensayo IMC) se refiere a un ensayo *in vitro* para medir la respuesta inmunitaria mediada por células a base de citocinas a un antígeno específico. Dicho ensayo utiliza una muestra extraída de una persona, en el que la muestra contiene células del sistema inmunológico. Las células del sistema inmunológico son capaces de producir moléculas efectoras inmunes tales como las citocinas tras la estimulación por un antígeno. Estos ensayos incluyen la incubación de la muestra con un antígeno y la medición de la presencia o cantidad de las moléculas efectoras inmunes tales como las citocinas para llevar a cabo una evaluación inmunológica de la persona o para proporcionar una indicación de la capacidad del sujeto para generar una respuesta inmunitaria mediada por células al antígeno seleccionado. De acuerdo con la presente invención, el ensayo IMC es preferentemente un ensayo ELISPOT. Células para su utilización en el ensayo IMC tal como un ensayo ELISPOT incluyen poblaciones aisladas de linfocitos y de las CPA, tal como una población de linfocitos T y CPA.

La preparación aislada de linfocitos y las CPA, en particular, los linfocitos T y las CPA, preparados según los presentes procedimientos proporciona una preparación que se puede utilizar en un ensayo IMC tal como un ensayo ELISPOT para su utilización en diagnóstico. Dichas preparaciones generan respuestas suficientes para permitir el diagnóstico. Tales respuestas se pueden definir como unos 50% superiores al fondo. Por otra parte, dichas respuestas se pueden definir como al menos el 50% de la respuesta máxima que se puede obtener una muestra recién aislada de sangre completa.

Por ejemplo, en un ensayo típico, pueden utilizarse $2,5 \times 10^5$ CMSP viables por pocillo en un ensayo ELISPOT. En un ensayo ELISPOT para tuberculosis, por lo general, una referencia negativa tendrá menos de 5 manchas. En este caso, una muestra positiva o reactiva, tendrá 6 o más manchas más que la referencia negativa. Si la referencia negativo tiene 6 o más manchas, una muestra de reactivo se indica si contiene más del doble del recuento de manchas que la referencia negativa.

En una realización los procedimientos de la presente invención utilizan una etapa de la selección por afinidad positiva o una etapa de selección por afinidad negativa para purificar las células de una muestra de sangre completa, antes o después del almacenamiento. Una etapa de selección por afinidad positiva se utiliza para unir estas células de interés a un soporte sólido y por lo tanto separar las células unidas de las células no unidas. Las células purificadas unidas se conservan, y las células no unidas se descartan.

En la alternativa, una etapa de selección por afinidad negativa se utiliza para eliminar aquellas células que no se necesitan o son indeseables en la preparación de las células para su utilización en el ensayo IMC, tal como un ensayo ELISPOT. Así, las células unidas al soporte sólido se descartan y las células no unidas purificadas se recuperan y se conservan.

El procedimiento dará lugar a la purificación tanto de los linfocitos (tales como las células T) como de las CPA. La purificación puede comprender la selección por afinidad positiva o negativa de los linfocitos y CPA, en cuyo caso habrá normalmente un enriquecimiento de la muestra de ambos tipos de células, es decir, tanto la relación de linfocitos T al número total de células aumentará en la muestra, como resultado de la realización del procedimiento de la invención.

De acuerdo con un aspecto de la invención, la muestra de sangre completa se almacena antes de purificar las células de la muestra de sangre completa por un procedimiento o proceso que incluye una etapa de selección por afinidad positiva o negativa. Por ejemplo, la muestra de sangre completa puede almacenarse antes del aislamiento de la población de células seleccionadas. Después del almacenamiento durante al menos 6 horas, al menos 8 horas, hasta 10, 12, 18, 24, 36 o 48 horas, la muestra de sangre completa se trata (es decir, se somete a la selección por afinidad) para aislar a la población de células seleccionadas, que puede utilizarse a continuación en el ensayo IMC, tal como un ensayo ELISPOT. En la alternativa, la muestra de sangre total se trata (es decir, se somete a la selección por afinidad) poco después de extraerse, por ejemplo, en 1 hora, hasta 6 horas, o hasta 8 horas después de que se ha obtenido para aislar la población celular seleccionada. Dicha población de células se almacena a continuación antes de su utilización en el ensayo IMC, tales como el ensayo ELISPOT.

Preferiblemente, la muestra de sangre completa se almacena entre -5°C y 40°C, normalmente entre 2°C y 8°C o entre 18°C y 25°C. En una realización particularmente preferida, la muestra de sangre completa se almacena a temperatura ambiente, tal como a unos 18°C o 20°C o desde 18°C a 25°C o de 20°C a 25°C.

En una realización la muestra no se congela en cualquier etapa de cualquiera de los procedimientos mencionados en esta memoria. En otra realización la muestra no se congela entre las etapas de ésta extrayéndose de la persona y almacenándose y purificándose (por un procedimiento de la invención), y/o la muestra no se congela entre las etapas de ésta, almacenándose, purificándose y utilizándose en un ensayo IMC.

En un aspecto de la presente invención, el procedimiento de purificación comprende una etapa de selección por afinidad negativa para eliminar granulocitos y de forma opcional glóbulos rojos de la muestra de sangre completa a fin de obtener la preparación de linfocitos y las CPA para su utilización en un ensayo ELISPOT.

Así, de acuerdo con el aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento en el que tanto los granulocitos como los glóbulos rojos se extraen de la muestra de sangre completa en una sola etapa. De acuerdo con este procedimiento, la muestra de sangre completa se pone en contacto con una preparación de anticuerpos que contiene anticuerpos anti-CD66b y glicoforina A. Los anticuerpos sirven para aglomerar glóbulos rojos y granulocitos. Los glóbulos rojos agregados y los granulocitos pueden ser eliminados de la muestra, por ejemplo, por centrifugación. La muestra también puede someterse a un gradiente de Ficoll antes de la centrifugación.

En otro aspecto de la invención, la selección por afinidad negativa comprende la utilización de un soporte sólido que tiene un ligando unido al mismo que se une a una proteína de superficie de células presentes en la superficie de granulocitos, que no se une a las proteínas de superficie de las células presentes en la superficie de linfocitos y de las CPA utilizados en el ensayo ELISPOT. Por ejemplo, puede suministrarse un soporte sólido que comprende un ligando anti-CD15 que se une a células CD15+ de la muestra y/o anti-CD66b para eliminar células CD66b+ de la muestra.

De acuerdo con este aspecto de la presente invención, una muestra de sangre completa o una muestra de sangre que ha sido tratada para eliminar los glóbulos rojos se pone en contacto con el soporte sólido que comprende un ligando anti-CD15 o el ligando anti-CD66b, en condiciones que permiten la unión de los granulocitos. La preparación de los linfocitos o de las CPA con granulocitos eliminados de los mismos se pueden obtener directamente, por ejemplo, poniendo en contacto la muestra con el soporte sólido y recogiendo cualquier material que no se una al soporte sólido.

En la alternativa, el soporte sólido que tiene granulocitos u otras células no deseadas unidas al mismo se puede separar del resto de la muestra. Por ejemplo, el soporte sólido puede contener bolitas tales como partículas magnéticas. Una vez los granos se han puesto en contacto con la muestra y en condiciones que permitan la unión de los granulocitos al soporte sólido, las bolitas se pueden separar de la muestra para dejar una preparación de linfocitos y las CPA con granulocitos eliminados de los mismos. En una realización preferida, el soporte sólido

comprende partículas magnéticas que pueden separarse del resto de la muestra, por ejemplo, mediante la aplicación de un campo magnético.

5 Se entiende que los demás ligandos, particularmente anticuerpos, capaces de unirse a un marcador de superficie celular en la superficie de los granulocitos, se pueden utilizar para la selección por afinidad negativa. Por ejemplo, los siguientes anticuerpos también se puede utilizar para eliminar los granulocitos por este procedimiento: anti-CD16b y/o anti-CD88.

10 Preferiblemente, de acuerdo con este aspecto de la presente invención los glóbulos rojos también se eliminan de la muestra de sangre completa. Esto se puede hacer antes, después o al mismo tiempo que la eliminación de las células que expresan CD15+ o granulocitos.

15 Los glóbulos rojos se pueden eliminar de la muestra por cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, los glóbulos rojos en la muestra pueden eliminarse por lisis de los glóbulos rojos (Simon *et al.*, *Immunol. Commun.* 1983, vol. 12, págs. 301 a 314).

20 De acuerdo con un aspecto de la invención, los glóbulos rojos se eliminan por filtración. De acuerdo con este aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de los linfocitos y las CPA para su utilización en un ensayo IMC tal como un ensayo ELISPOT que comprende la filtración para eliminar los glóbulos rojos. Estos procedimientos se pueden utilizar solos o con uno o más de los demás procedimientos de la invención, tal como la selección por afinidad negativa con ligandos anti-CD15+ para eliminar los granulocitos.

25 Los procedimientos de filtración de la presente solicitud incluyen la aplicación de una muestra de sangre a un filtro. Los filtros se seleccionan de manera que los glóbulos rojos pasen a través del filtro mientras que los linfocitos y las CPA son retenidos en el filtro. Los linfocitos y las CPA pueden recogerse, por ejemplo lavando el filtro o contralavando el filtro y recogiendo los linfocitos y CPA recuperados.

30 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, una preparación de linfocitos y CPA se purifica a partir de una muestra de sangre completa por un procedimiento que implica una etapa afinidad positiva, en la cual opcionalmente, la etapa de selección por afinidad selecciona todos los tipos de linfocitos T (por ejemplo, independientemente de si son CD4 o CD8, o independientemente del epítipo que reconozcan).

35 En un aspecto, la muestra de sangre completa se pone en contacto con un soporte sólido con ligandos unidos al mismo que se unen a las proteínas de superficie de las células presentes en la superficie de los linfocitos y de las CPA. Los ligandos pueden ser anticuerpos.

40 En un aspecto preferido de la presente invención, dichos ligandos son seleccionan de ligandos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD45, anti-CD45RC y anti-CD14. Por ejemplo, puede proporcionarse un soporte sólido que se une a células CD4+, CD8+ CD14+ y CD19+ en la muestra de sangre completa o un subconjunto tal como células CD4+, CD8+ y CD19+. El aislamiento de dichas células proporciona una preparación de linfocitos y CPA que son adecuados para su utilización en el ensayo ELISPOT. Dicha preparación puede incluir una mezcla de linfocitos T CD4+ y CD8+, linfocitos B y monocitos. En una realización, los ligandos anti-CD4 y/o anti-CD8 no se utilizan en la etapa de purificación, y, preferentemente, los anticuerpos anti-CD4 y/o anti-CD8 no se utilizan en la etapa de purificación.

45 En una realización preferida, se seleccionan los ligandos sobre el soporte sólido de manera que las células no deseadas en la preparación final, tales como los granulocitos no se conservan en el soporte sólido. Por ejemplo, los ligandos se seleccionan de manera que sean específicos para los linfocitos y las CPA y no se unan a los granulocitos. El soporte sólido puede suministrarse con ligandos anti-CD4, anti CD8 y anti-CD19 u otros ligandos apropiados en aproximadamente las mismas proporciones. Por otra parte, la proporción de cada ligando individual se puede seleccionar, por ejemplo, para que refleje la proporción de cada célula presente en la sangre. En la alternativa, la relación de los ligandos, tales como de los ligandos CD4:CD8:CD19 puede seleccionarse para unir y aislar los linfocitos y las CPA en una proporción deseada, tal como especialmente adecuada para su utilización en un ensayo ELISPOT.

50 Los procedimientos de selección por afinidad que utilizan soportes sólidos con ligandos unidos a los mismos para unirse a las proteínas seleccionadas son bien conocidos en la materia. En general, una muestra de sangre completa se pone en contacto con el soporte sólido que comprende los ligandos de interés, en condiciones que permiten la unión de las células a los ligandos a través de la proteína de la superficie celular pertinente. El soporte sólido puede separarse del resto de la muestra con el fin de separar las células unidas del material no unido. Pueden incluir etapas de lavado, por ejemplo, para enjuagar el material no unido del soporte sólido.

55 En un aspecto preferido de la presente invención, el soporte sólido comprende partículas magnéticas. Dichas partículas magnéticas se pueden separar fácilmente de una muestra, por ejemplo, mediante aplicación de un campo magnético. Cuando el soporte sólido se proporciona en forma de partículas magnéticas u otros tipos de bolitas, cada bolita puede tener un único ligando presente en el mismo, tal como un ligando anti-CD4. Cada una de las bolitas que

transportan cada ligando, tales como anti-CD4, anti-CD8, anti-CD14 o anti-CD19 se pueden combinar para producir un soporte sólido que se une a las células deseadas, tales como las células CD4+ y CD8+, CD14+ y CD19+. En la alternativa, cada bolita magnética se puede proporcionar con más de un ligando, tales como tanto los ligandos anti-CD4 como los anti-CD8 o los ligandos anti-CD4 y ligandos anti-CD19 o una combinación de todos los ligandos. En una realización particularmente preferida, la relación de los ligandos, tales como anti-CD4: anti-CD8: anti-CD19 se selecciona para correlacionarse con la relación de los linfocitos y las CPA deseadas en la preparación final para su utilización en el ensayo ELISPOT. La cantidad de partículas magnéticas también puede seleccionarse a fin de aislar un número seleccionado de células, para facilitar el tratamiento posterior de la preparación para su utilización en el ensayo ELISPOT.

La preparación de las celdas seleccionadas y, en particular de linfocitos y CPA que están unidos al soporte sólido puede utilizarse en un ensayo directamente. En particular, bolitas magnéticas con células relevantes unidas a las mismas pueden utilizarse en un ensayo IMC, tal como un ensayo ELISPOT. Preferentemente, las bolitas con células unidas a las mismas se lavan antes de su utilización en el ensayo. En la alternativa, una vez que las celdas seleccionadas se han aislado del resto de la muestra de sangre completa, las células unidas al soporte sólido pueden separarse del soporte sólido para su utilización en el ensayo.

Los inventores describen además un procedimiento en el que una muestra de sangre completa se trata por dilución con medio de cultivo celular y se almacena antes de ser utilizada en el ensayo IMC tal como un ensayo ELISPOT. La muestra diluida de sangre completa puede almacenarse durante al menos 6 horas después de la recogida, por ejemplo, durante al menos 8 horas después de la recogida de un individuo, preferentemente hasta 10, 12, 18, 24, 36 o 48 horas después de la recogida.

a muestra de sangre completa puede estabilizarse o tratarse antes de su almacenamiento. Por ejemplo, el procedimiento comprende diluir una muestra de sangre completa con el medio de cultivo celular, de tal manera que cuando la muestra de sangre completa o una preparación aislada de las linfocitos T y CPA obtenida de dicha muestra de sangre almacenada completa se utiliza en un ensayo ELISPOT hasta 48 horas después de la recogida de la muestra se mantiene una respuesta viable.

a muestra de sangre completa puede diluirse con medio de crecimiento celular en cualquier relación apropiada. La proporción de muestra de sangre completa a medio de crecimiento celular puede ser 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, hasta 10:1, 20:1 o 30:1. Por otra parte, la relación de muestra de sangre completa a medio de crecimiento celular puede ser 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 o 1:10, hasta 1:15, 1:20 o 1:30.

El medio de dilución puede añadirse a la muestra de sangre completa, pero no está sometido a agitación o mezcla mecánica. La muestra de sangre completa se almacena preferentemente en un tubo con heparina convencional. Preferentemente, la muestra de sangre completa se almacena en la oscuridad.

El medio de cultivo celular puede ser cualquier medio de cultivo celular apropiado. Por ejemplo, el medio puede ser un medio disponible en el mercado como el AIM-V (Invitrogen Paisley, Reino Unido), o RPMI 1640[®] (Sigma Aldrich Corp, St. Louis, Missouri, EE.UU.). El medio de cultivo celular puede ser medio sin suero, como el AIM-V.

De acuerdo con un aspecto de la invención dicha muestra de sangre tratada se utiliza o se prepara para su utilización en un ensayo IMC después de su almacenamiento. Por lo general, una preparación de CMSP, o linfocitos T y CPA se purifican a partir de dicha muestra de sangre tratada después de su almacenamiento para utilización en el ensayo IMC. Góbulos rojos y granulocitos se eliminan de la muestra tratada de sangre completa, por ejemplo, para aislar una preparación de linfocitos y CPA, por un procedimiento que incluye una etapa de selección por afinidad.

El tratamiento por dilución puede utilizarse también para tratar una preparación aislada de linfocitos y CPA antes del almacenamiento de la preparación antes de su utilización en un ensayo IMC.

En otro aspecto de la invención, la sangre completa puede almacenarse, con o sin dilución, durante varias horas, preferentemente durante al menos 6 horas, o hasta 12 horas, o de 12 a 48 horas. Dicho almacenamiento, puede ser entre 2 y 8°C, o a temperatura ambiente. Después del almacenamiento, una preparación de linfocitos y CPA puede prepararse por la selección por afinidad como se describió anteriormente, y, opcionalmente, la respuesta específica de linfocitos T al péptido en la preparación se puede medir en un ensayo IMC. De esta manera, la actividad *in vitro* de las linfocitos T introducidos en el ensayo IMC se estabiliza y se mantiene. Por consiguiente, este enfoque reduce o evita una marcada reducción en la actividad de linfocitos T *in vitro* que se observa en las preparaciones de linfocitos y las CPA aislados, utilizando, por ejemplo, gradientes de Ficoll convencionales a partir de una muestra de sangre completa, cuando la muestra de sangre se almacena durante varias horas antes a la etapa de aislamiento.

Los inventores describen un kit para la realización de un ensayo ELISPOT en las células que se han almacenado y purificado por un procedimiento tal como se describe en esta memoria, en el que el kit comprende:

- (i) una anticuerpo específico para citocina, opcionalmente unido a una placa de microvaloración, y
- (ii) una o más de los ligandos mencionados en esta memoria que puede utilizarse en la selección por afinidad,

opcionalmente unido a un soporte sólido, y

(iii) opcionalmente instrucciones para llevar a cabo el ensayo ELISPOT y/o el procedimiento de almacenamiento y purificación de las células.

5 En otra realización, los procedimientos de selección por afinidad positiva o negativa pueden utilizarse para aislar una preparación de células para su utilización en un ensayo IMC como un ensayo ELISPOT, dichas células proceden de muestras de sangre completa que han sido tratadas por dilución y almacenadas.

10 Cualquiera de las realizaciones anteriores puede llevarse a cabo en una muestra de un ejemplo humano, tal como un ser humano que se sospecha que tiene una enfermedad que puede diagnosticarse por ELISPOT.

La invención se describe a continuación con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 - Tratamiento por dilución con medio de cultivo

15 Inmediatamente después de la punción venosa, un Vacutainer de 10 ml de heparina de litio (BD Biosciences, Oxford, Reino Unido) de sangre completa de cada uno de un total de 78 donantes y se procesó durante 6 meses, utilizando el kit de análisis T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Abingdon, Reino Unido). El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante que acompaña al kit. Este procedimiento comprende: a) un método FicolI convencional para la preparación de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) - véase en I Recogida y preparación de muestras, Procedimiento 2 "métodos alternativos de recogida de sangre" y la Nota 2.; b) se hizo el recuento de las células viables utilizando el método de exclusión del colorante azul de tripano (Freshney, R. (1987) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, pág. 117, Alan R. Liss, Inc., Nueva York), c) las células se diluyeron en GIBCO AIM-V (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) para dar 250 mil células por cada 100 l. d) 250.000 (100 l) de las células extraídas de FicolI-se añadieron a cada placa de microvaloración bien recubiertas previamente con anti-interferón gamma, junto con uno de los siguientes: referencia positiva fitohemaglutinina (PHA); o antígenos específicos de ensayo de *M. tuberculosis* (panel A; panel B), o de citomegalovirus / virus de Epstein Barr / virus de la gripe (CEF; Mabtech, Suecia), cuyo antígeno no se proporciona en el kit de T-SPOT.TB; e) la placa se incubó durante 16 a 20 horas (37°C, CO₂ al 5%), se lavan cuatro veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de añadir un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina e incubando durante 1 hora entre 2 y 8°C; f) los pocillos se lavaron cuatro veces, y a continuación se añadió 5-bromo-4-cloro-3'indoilfosfato/nitro azul tetrazolio (BCIP/NBT) y se incubó durante 7 minutos. Una vez se habían desarrollado las manchas, se interrumpió la reacción con agua destilada; g) después de secar a 37°C durante 4 horas, el número de células formadoras de manchas (SFC) para cada pocillo así se registró y se analizó.

35 a sangre restante de cada donante se diluyó 1:1 en AIM-V y se almacenó a temperatura ambiente (18-25°C) en la oscuridad durante la noche durante 24 horas.

40 El 2º día, el ensayo de T-SPOT.TB se realizó en la sangre almacenada, incluido el método FicolI convencional para la preparación de CMSP. El ensayo T-SPOT.TB se llevó a cabo a continuación para determinar los recuentos de SFC, utilizando una referencia positiva (PHA) y una referencia cero (que carece de antígeno). La referencia cero se sustrajo del recuento de SFC del pocillo con antígeno de ensayo. Si alguno de los pocillos con antígeno contenía seis o más manchas y la referencia cero contiene cero manchas, entonces la muestra se consideraba 'reactiva' para ese antígeno en ensayo.

45 Las siguientes tablas muestran la relación entre la sangre fresca, diluida y almacenada. Resultados reactivos y no reactivos se muestran utilizando el panel A, panel B y los pocillos de CEF de cada muestra de sangre de los donantes, tanto antes como después del almacenamiento de sangre de toda la noche (después de la dilución 1:1 en AIM-V) a temperatura ambiente (t. a.). Se indica también el porcentaje del número total de donantes. El antígeno CEF se disolvió en AIM V, y estuvo presente en el ensayo a una concentración de 5 mg/ml.

50

Antígeno del panel A		
	Sangre reciente	
Sangre diluida/almacenada	Reactiva	No reactiva
Reactiva	3 (3,8%)	1 (1,3%)
No reactiva	2 (2,6%)	72 (92,3%)

96,2% de concordancia clínica

Antígeno del panel B	
	Sangre reciente

Sangre diluida/almacenada	Reactiva	No reactiva
Reactiva	5 (6,7%)	0 (0%)
No reactiva	3 (4%)	67 (89,3%)

96% de concordancia clínica

Antígeno CEF		
	Sangre reciente	
Sangre diluida/almacenada	Reactiva	No reactiva
Reactiva	28 (77,8%)	0 (0%)
No reactiva	5 (13,9%)	3 (8,3%)

5 Los resultados demuestran el 86,1% de concordancia clínica (suponiendo que 6 manchas mayor que la referencia cero indica reactividad).

10 Por lo tanto, la suma de medio a la muestra de sangre permite medir una respuesta positiva a SFC en CMSP después de 24 horas de almacenamiento, una respuesta que es similar a la observada cuando se mide en la sangre procesada inmediatamente después de la extracción. La sangre extraída y almacenada durante 24 horas sin adición de medio demostró una pérdida significativa en la respuesta de IMC medible (resultados no mostrados).

Ejemplo 2 - Selección por afinidad positiva

15 El día 1, y a las 2 horas de la punción venosa, dos Vacutainers con 10 ml de heparina de litio de sangre completa de cada nueve donantes se colocaron en almacenamiento, uno en la oscuridad a t. a. (18-25°C) y el otro en la nevera (2-8°C).

20 En cada momento, ya sea 0-2 horas (reciente) o 24 horas (almacenado) después de la punción venosa para cada donante, 3 ml de sangre completa se diluyeron 1:1 con tampón de lavado (PBS/BSA al 0,1%/EDTA 2 mM) y se mezcló con 80 l de una mezcla de Dynabeads magnético específico, es decir, 111,45 (CD4), 111,47 (CD8), 111,49 (CD14) y 111,43 (CD19), que se mezclaron en proporciones iguales (Invitrogen). Estas "bolitas" seleccionan positivamente células basadas en la presencia de marcadores de diferenciación específica (CD): CD4 y CD8 para subconjuntos de linfocitos T, CD14 (monocitos) y CD19 (linfocitos B y de CPA).

25 Las muestras se mezclaron a t. a. durante 12 minutos y las bolitas se separaron colocando tubos de muestra en un concentrador de partículas magnéticas (MPC: Invitrogen, Paisley, Reino Unido) durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y las bolitas se lavaron dos veces en PBS y después se separaron de nuevo en el MPC. Las bolitas se volvieron a poner en suspensión en 1 ml de AIM-V y se hizo el recuento de las células utilizando el método de exclusión del colorante azul de tripano. Las células se diluyeron en el AIM-V para dar a 250.000 células por cada 30 100 µl.

En paralelo, en cada momento, ya sea 0-2 horas (reciente) o 24 horas (almacenado) después de la punción venosa para cada donante, se procesaron inmediatamente 5 ml de sangre completa por el método de Ficoll como se indica en el Ejemplo 1.

35 Todas las muestras procesadas se analizaron a continuación, utilizando el kit de ensayo T.SPOT.TB (véase el Ejemplo 1), utilizando antígenos CEF (5 µg/ml), o PPD (1 µg/ml), o PPD/CEF (1 µg/ml y 5 mµg/ml, respectivamente) en los pocillos de ensayo, ninguno de los cuales se proporcionan en el kit T-SPOT.TB; se obtuvo PPD (código de producto RT23) de Statens Serum Institut (Copenhague, Dinamarca), por CEF, véase el Ejemplo 1. PPD y el CEF se 40 utilizaron para identificar linfocitos T CD4+ y CD8+, respectivamente.

45 La Tabla siguiente, que incorpora el promedio de los resultados de todos los donantes, presenta los recuentos de SFC medidos por ELISPOT para las celdas seleccionadas a partir de sangre fresca o almacenada utilizando bolitas magnéticas conjugadas con CD4, CD8, CD14 y CD19 en comparación con la utilización de Ficoll sólo. La sangre almacenada a t. a. durante 24 horas y seleccionada utilizando bolitas ha producido resultados comparables a los de las muestras "bolita reciente", y dará mejores resultados que cuando muestras "Ficoll sólo" se almacenan a t. a., y tanto "Ficoll sólo" como las "bolitas" se almacenan a 4°C.

Antígeno	Reciente		Almacenados (24 horas)			
	Ficoll	Bolitas	Ficoll (4°C)	Ficoll (22°C)	Bolitas (4°C)	Bolitas (22°C)
PPD	100	78	15	41	53	70
CEF	100	194	13	45	111	149
PPD/CEF	100	136	14	43	82	109
PPD		71,40	18,21	35,06	67,34	49,67
CEF		109,20	18,51	37,24	87,54	109,40
PPD/CEF		81,80	1,52	2,85	40,89	56,25

Los resultados se normalizaron, asumiendo que las muestras 'recientes', tratadas con Ficoll solo, proporcionan un recuento de SFC del 100% en el ensayo ELISPOT. Las tres primeras filas muestran los recuentos medios de SFC, y las tres últimas filas muestran las desviaciones estándar.

Ejemplo 3 - Selección por afinidad negativa

Inmediatamente después de la punción venosa, dos Vacutainers de 10 ml con heparina de litio de sangre se recogieron de cada uno de los cuatro donantes en espacio de 1 mes.

una muestra de cada donante, se llevó a cabo una etapa de selección negativa utilizando bolitas magnéticas anti-CD15 MACSI (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania). Las bolitas se volvieron a poner en suspensión completamente antes de su uso para asegurar una dispersión homogénea. Se añadieron 400 µl de bolitas a 4 ml de sangre completa en un tubo cónico de 15 ml. Se incubaron los tubos a t. a. utilizando el tubo rotativo MACSimix (Miltenyi Biotech) a una velocidad media (8 rpm) durante 15 minutos. Se colocaron los tubos en el separador MACSiMag (Miltenyi Biotech), y las bolitas se dejaron adherir a la pared del tubo durante 2 minutos. Manteniendo el tubo en el imán, se eliminaron los sobrenadantes con una pipeta y se conservaron en un tubo nuevo. Los tubos que contienen los sobrenadantes se colocaron de nuevo en el separador MACSiMag y algunas bolitas residuales se dejaron adherir a la pared del tubo durante 2 minutos. Manteniendo el tubo en el imán, el sobrenadante se transfirió a un tubo cónico de 50 ml. Se añadieron 16 ml de tampón de lisis de 1 × glóbulos rojos (GR) recién preparado (preparado por dilución de 10 × tampón de lisis: NH₄Cl 1,55 M, KHCO₃ 100 mM, EDTA 10 mM) y se incubaron los tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos. Las células sedimentadas se lavan dos veces en tampón de lisis (5 ml) y se centrifugaron cada vez a 300 x g durante 5 minutos. Las células se lavaron una vez en RPMI y se diluyeron en 1 ml de AIM-V para su utilización en un ensayo ELISPOT.

En paralelo con este método y el utilizando una segunda muestra de cada donante, se trataron 5 ml de sangre completa por el método Ficoll convencional tal como se indica en el Ejemplo 1.

Se analizaron a continuación muestras de CMSP purificadas en el ensayo T.SPOT.TB, como se indica en el ejemplo 1, utilizando CEF (5 mg/ml) como antígeno para las muestras de los donantes 1,2 y 4; y antígenos del panel A y B (33 mg/ml) para las muestras del donante 3.

El recuento de SFC obtenido con las CMSP (mostrado en las tablas siguientes) preparado utilizando un estrategia de selección negativa con bolitas magnéticas anti-CD15 MACSI demostró alta equivalencia con las CMSP que se prepararon utilizando gradientes de Ficoll. Este método basado en anticuerpos de aislamiento de CMSP demostró ser técnicamente viable y produjo resultados muy reproducibles en el análisis T-SPOT.TB.

	Donante 1		Donante 2			Donante 3			Donante 4	
	Ficoll	MACSi	Ficoll	MACSi		Ficoll	MACSi		Ficoll	MACSi
CEF	240	239	100	111	-	0	0	-	0	0
	248	235	98	124	+	>100	>100	+	116	100
Media	244	237	99	117,5	panel A	41	31	CEF	187	240
Desv. estd.	5,66	2,83	1,41	9,19		45	42		210	214
					panel B	44	38		180	189
					panel B	179	99	Media		
						157	106	-	0	0
						151	83	+	116	100
					Media			CEF	192,3	214,3
					panel A	43,3	37	Desv. Estd.		
					panel B	162,3	96	-	0	0
					Desv. Estd.			+	0	0
					panel A	2,08	5,57	CEF	15,70	25,50
					panel B	14,74	11,75			

(Nota: Para los donantes 3 y 4, (-) los pocillos indican ausencia de antígeno, (+) los pocillos indican presencia de PHA 5 µg/ml).

5 **Ejemplo 4 - Selección por afinidad negativa**

Se realizaron dos experimentos independientes, utilizando cada uno la sangre completa mezclada de un grupo de 15 u 11 donantes.

- 10 Para cada experimento: a) el día 1, inmediatamente después de la punción venosa, un Vacutainer de 10 ml de heparina de litio de sangre completa de cada grupo de donantes se procesó de acuerdo con el método Ficoll estándar (véase el Ejemplo 1). Se hizo el recuento de CMSP viables utilizando el método de exclusión del colorante azul de tripano. Las células se diluyeron en medio de cultivo celular (AIM-V) para dar 250.000 células por cada 100 µl, b) el resto de la sangre se almacena en la oscuridad, sin diluir, ya sea en un frigorífico entre 2 y 8°C o a t. a. (18-25°C) durante 24 horas; c) el día 2, se procesaron muestras de sangre almacenada de acuerdo con el método Ficoll estándar para la preparación de CMSP, y se hizo el recuento de las células viables y se diluyeron como se describió anteriormente (véase el párrafo 1 de este ejemplo).

20 En las muestras procesadas en paralelo en cada experimento, tanto en el día 1 (fresco) como el día 2 (almacenadas) de cada donante, 4,5 ml de sangre completa se añadieron en tubos de 15 ml de tubos de centrifugadora, y 225 µl de RosetteSep (StemCell, Vancouver, BC, Canadá) se añadieron a cada tubo para unir la CNA a los granulocitos utilizando un complejo tetrámero que contiene anticuerpos anti-CD66b y glicoforina A anticuerpos. Las muestras se mezclaron suavemente y se dejaron incubar durante 20 minutos a t. a. Las muestras se diluyeron a continuación 1:1 con RPMI, y los CMSP se aislaron de las células sin granulocitos por el método de Ficoll convencional (ver Ejemplo 1), dejando así que los glóbulos rojos y granulocitos se separen de los linfocitos y las CPA. Estas últimas células se lavaron a continuación y se trataron de acuerdo con las instrucciones del fabricante que se adjuntan al kit - véase el Ejemplo 1.

30 En los dos experimentos independientes realizados, uno utilizó CEF (5 µg/ml) como antígeno, y el otro utilizó PPD (1 µg/ml) en el ensayo. Tabla superior: recuentos medios de SFC producidos por CEF de 15 donantes) para el tratamiento con Ficoll y RosetteSep a 4°C, y t. a. Tabla inferior: recuentos de SFC producidos por PPD (media de 11 donantes) para el tratamiento con Ficoll y RosetteSep después del almacenamiento a 4°C y t. a. Los resultados demuestran que las muestras almacenadas a 4°C y luego sometidas a tratamiento con anticuerpos anti-granulocitos seguido de purificación con Ficoll de CMSP son equivalentes a las muestras patrón 'recientes', y también producen recuentos SFC mayores que cuando las muestras se almacenan a t. a. antes del tratamiento con anticuerpos anti-granulocitos.

CEF	Ficoll reciente	Ficoll, 4°C	RosetteSep, 4°C	Ficoll t. a.	RosetteSep, t. a.
Media	80	54	78	39	60
suma	4870	3252	4759	2388	3681
% dif. De Ficoll reciente		-33,2	-2,3	-51	-24,4

n = 15 donantes, 61 repeticiones

PPD	Ficoll reciente	Ficoll, 4°C	RosetteSep, 4°C	Ficoll t. a.	RosetteSep, t. a.
Media	22,6	9,4	21,4	8	17,4
suma	722	301	685	256	558
% dif. De Ficoll reciente		-58,31	-5,12	-64,54	-22,71

donantes, 32 repeticiones

5

Ejemplo 5 – Filtración

La viabilidad de la utilización de membranas filtrantes de leucocitos contralavadas (Pall Medical) y también la estabilidad de las células capturadas en dichas membranas como se investigó a las T0 y T24 horas después de la punción venosa. Las células capturadas se almacenaron en las membranas en un frigorífico (2-8°C) de un donante y a t. a. (18-25 ° C) para el segundo donante. Este procedimiento de separación por membrana se llevó a cabo junto a un método de Ficoll convencional de separación de CMSP en cada momento y temperatura.

Las membranas que se necesitaban almacenar siguieron las etapas seguidas 1-3 (ver más abajo) y a continuación se sometieron a las condiciones de almacenamiento adecuadas y a su duración. Los dispositivos de soporte de membrana se retiraron a continuación del área de almacenamiento y se sometieron a las etapas 4-7 (ver más abajo) al punto de tiempo oportuno. Las muestras de almacenamiento de control de Ficoll se mantuvieron en la oscuridad a t. a. y se diluyeron 1:1 en el medio de cultivo celular AIMV hasta que se necesiten para el tratamiento por el método convencional de separación de Ficoll. El procedimiento de la membrana se describe a continuación:

Las etapas 1-3 se componen de: 10 ml de TAMPÓN DE LAVADO 1 filtrándose a través de la membrana, utilizando la jeringuilla de transferencia, en la botella de residuos. 10 ml de muestra de sangre completa, junto con 50 ml de TAMPÓN DE LAVADO 1 se mezclaron en primer lugar y luego se filtraron a través de la membrana LK4, utilizando la jeringa de la transferencia, en una botella de residuos. 50 ml de TAMPÓN DE LAVADO 1 enfriado se filtraron a través de la membrana LK4, utilizando la jeringa de la transferencia, en la botella de residuos.

Las etapas 4 a 7 se componían de: el filtro de membrana que se invertía, inmediatamente o después de 24 h (dependiendo del momento). 50 ml de TAMPÓN DE ELIMINACIÓN 1 enfriado se volvieron a filtrar a través de la membrana, utilizando la jeringa de contralavado, en un tubo Falcon de 50 ml. La suspensión celular se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos a t. a. y luego se volvió a poner en suspensión en 10 ml de AIMV. La suspensión de células se centrifugó de nuevo a 2000 rpm durante 5 minutos a t. a. y se volvió a poner en suspensión en 1 ml de medio y se hizo el recuento según el método convencional de separación de Ficoll. (TAMPÓN DE LAVADO 1: 500 ml de medio AIMV tamponado con HEPES 20 mM y dextrano T40 al 1% [p/v]) (TAMPÓN DE ELIMINACIÓN 1: 500 ml medio AIMV tamponado con HEPES 20 mM y T40 dextrano al 0,1% [p/v]).

El ensayo T-SPOT.TB se llevó a cabo a continuación, como se indica en el ejemplo 1 y también en las instrucciones del fabricante que acompañan cada kit.

La tabla siguiente describe un resumen de los resultados de las pruebas de T-SPOT.TB llevado a cabo para esta investigación. Se muestra una comparación de los recuentos de manchas de CEF con respecto al tiempo y la temperatura de los experimentos de la membrana. Esto se llevó a cabo desde el punto de vista del rendimiento de las membranas en relación a los controles de Ficoll pertinentes llevados a cabo en el mismo día y también su relación a T0.

	Fecha	Donante	Método	Temp.	Recuento de EFC (med. n=4)	Porcentaje de referencia de Ficoll	Porcentaje de referencia de Ficoll aT0
T0	4/05/2006	0002	Ficoll	(t. a.)	45,5	~	~
			LK4	2-8°C	11	24,2	~
		0008	Ficoll	(t. a.)	44,4	~	~
			LK4	t. a.	21,5	47,9	~
T24	5/04/2006	0002	Ficoll	(t. a.)	47,5	~	104,4
			LK4	2-8°C	10,5	22,1	23,1
		0008	Ficoll	(t. a.)	33,75	~	76,0
			LK4	t. a.	4,75	14,1	10,7

Se puede observar en la tabla anterior, las membranas utilizadas con sangre completa reciente, se almacena entre 2 y 8°C y 18-25°C (t. a.), tanto a T0 como a T24 han proporcionado CMSP que producen suficiente señal de CEF para la utilización en el ensayo ELISPOT. Se ha demostrado en este caso el concepto de utilizar lavado membranas filtrantes contralavadas para recoger las CMSP capaces de provocar una respuesta en el ensayo ELISPOT.

Ejemplo 6 - Tiempo de almacenamiento antes de la selección por afinidad negativa

Se realizaron dos experimentos independientes, utilizando muestras de sangre completa de cada uno de los 15 donantes.

Para cada experimento: a) el día 1, inmediatamente después de la punción venosa, se procesó una Vacutainer de 10 ml con heparina de litio de sangre completa de cada donante (muestras `recientes`), según el método Ficoll convencional para la preparación de CMSP, b) el resto de la sangre de cada donante se guardó en la oscuridad, sin diluir, en un frigorífico entre 2 y 8°C (muestras almacenadas) de las varias horas (16 a 72 horas), c) el día 2, las muestras almacenadas se incubaron con RosetteSep (StemCell, Vancouver, BC, Canadá), tal como se describe en el Ejemplo 4, luego se procesaron de acuerdo con el método Ficoll convencional para la preparación de CMSP. El recuento y la dilución de CMSP se llevó a cabo a continuación, y las muestras procesadas, según el Ejemplo 4, excepto que en los dos experimentos independientes realizados, uno utilizó CEF (5 µg/ml) como antígeno, y el otro utilizó CEF/PPD (5 µg/ml y 1 µg/ml, respectivamente) en el ensayo.

Los resultados que se muestran a continuación representan los recuentos de SFC acumulados registrados para todas las muestras de donantes individuales, después cada uno se habían sometido a diferentes condiciones de tratamiento, utilizando antígenos CEF (n = 10) o utilizando tanto antígenos CEF como PPD (n = 5), basados en sumar la media del resultado de tres ensayos ELISPOT por separado para cada muestra procesada.

Los datos demuestran que las muestras almacenadas entre 16 y 24 horas entre 2 y 8°C pueden estabilizarse posteriormente con anticuerpos anti-granulocitos antes de ser procesados con Ficoll, mientras que los periodos de almacenamiento más largos seguidos de las mismas condiciones de purificación dan lugar a una reducción gradual en los recuentos de SFC en el ensayo ELISPOT.

Antígeno	Ficoll reciente	RosetteSep, almacenado entre 2 y 8°C				
		16 h	20 h	24 h	48 h	72 h
CEF	940	900	846	892	661	354
CEF / PPD	481	502	476	584	324	108

Similares resultados se obtuvieron cuando las muestras se almacenan a t. a. hasta 48 horas antes de "estabilizarse" y procesarse con Ficoll.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de realización de un inmunoanálisis *in vitro* mediado por células que comprende:

- 5 (i) almacenar una muestra de sangre completa extraída de un individuo durante al menos 6 horas *in vitro*,
 (ii) purificar una población de células que contienen linfocitos T y células presentadoras de antígenos (CPA)
 de granulocitos que están presentes en dicha muestra almacenada, mediante un procedimiento que
 incorpora una etapa de selección por afinidad negativa para eliminar granulocitos o una etapa de selección
 10 por afinidad positiva utilizando ligandos que se unen a proteínas de la superficie celular presentes en la
 superficie de linfocitos T y de las CPA unidas a un soporte sólido para separar dicha población de
 granulocitos; y
 (iii) utilizar dicha población de células en un inmunoanálisis mediado por células, para medir las repuestas
 de la citocina específica para el antígeno en linfocitos T.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha muestra se almacena durante al menos 10 horas o al
 menos 12 horas, u opcionalmente entre 12 y 36 horas o 24 y 48 horas.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que dicha muestra se almacena entre 2 y
 8°C o entre 18 y 25°C.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha etapa (ii) del procedimiento comprende una etapa de
 selección por afinidad negativa para eliminar granulocitos, en el que la muestra se pone en contacto con una
 preparación de anticuerpos que contiene anticuerpos anti-CD66b y glicoforina A. Los anticuerpos sirven para
 aglomerar glóbulos rojos y granulocitos, y dichos glóbulos rojos y granulocitos se eliminan de la preparación por
 25 centrifugación.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha etapa (ii) del procedimiento comprende eliminar
 granulocitos poniendo en contacto dicha muestra con un soporte sólido anti-CD15 para eliminar las células CD15+
 de la muestra, en el que opcionalmente dicho soporte sólido comprende bolitas magnéticas y en el que
 30 opcionalmente el procedimiento comprende poner en contacto la muestra con las bolitas magnéticas para unir las
 células CD15+ a las bolitas, y separar las bolitas que tienen las células CD15+ unidas a las mismas de la muestra.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los glóbulos rojos en la muestra se eliminan por lisis o por
 filtración, antes de la etapa (iii).
- 35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la purificación conduce a un aumento
 en la muestra tanto de la relación de linfocitos T a las células totales y de la relación de células presentadoras de
 antígenos a células totales ; y/o en el que la muestra no está congelada en ningún punto antes del almacenamiento,
 purificación o utilización en dicho inmunoanálisis mediado por células.
- 40 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa (ii) comprende una etapa de
 selección por afinidad positiva para dichas células, en el que opcionalmente la etapa de selección por afinidad
 selecciona todos los tipos de linfocitos T.
- 45 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la etapa (ii) comprende poner en contacto dicha muestra con
 un soporte sólido que tiene unido al mismo ligandos que se unen a las proteínas de la superficie celular presentes en
 la superficie de dichos linfocitos T y células presentadoras de antígenos para de este modo aislar la preparación de
 linfocitos T y células presentadoras de antígenos, en el que opcionalmente:
- 50 - dicho soporte sólido comprende uno o más ligandos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19 y anti-CD14 para aislar
 células CD4+, CD8+, CD19+ y/o CD14+ de la muestra de sangre completa, y/o
 - dicha preparación de linfocitos T y células presentadoras de antígenos se separan del soporte sólido antes
 de su utilización en la etapa (iii), y/o
 - dicha preparación de linfocitos T y células presentadoras de antígenos son retenidas en dicho soporte sólido
 55 para su utilización en la etapa (iii), y/o
 - dicho soporte sólido comprende bolitas magnéticas, en el que opcionalmente cada una de dichas bolitas
 tiene unido a la misma un ligando anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD19, y preferentemente cada bolita magnética
 tiene unido a la misma uno o más anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD19, y dichas bolitas magnéticas se mezclan
 para proporcionar el soporte sólido que se une a las células CD4+, CD8+ y CD19+.
- 60 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inmunoanálisis mediado por
 células es un análisis ELISPOT.
- 65 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se lleva a cabo en una muestra de un ser
 humano, opcionalmente en el que la muestra se utiliza en un inmunoanálisis mediado por células para diagnosticar
 una enfermedad.