

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 479**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2007** **E 07712923 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013** **EP 2005182**

54 Título: **Correlatos clínicos**

30 Prioridad:

17.03.2006 GB 0605474

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
20.09.2013

73 Titular/es:

LALVANI, AJIT (100.0%)
39 Lonsdale Road
Oxford, OX2 7ES, GB

72 Inventor/es:

LALVANI, AJIT y
MILLINGTON, KERRY

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 423 479 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

Correlatos clínicos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con métodos para monitorear infecciones micobacterianas, tales como infección por *Mycobacterium tuberculosis* y usos de estuches en tales métodos.

10 **Antecedentes de la invención**

Existe una necesidad de marcadores del estado de infección de un individuo. El uso de tales marcadores permite el tratamiento, la prevención y el control de la enfermedad relevante. Por ejemplo, monitorear el estado de un individuo infectado con tuberculosis (TB) es esencial para el tratamiento, prevención y control de esta enfermedad en resurgimiento. La carga micobacteriana no puede medirse directamente y actualmente no existe un biomarcador que refleje la carga micobacteriana. Adicionalmente, el *Mycobacterium tuberculosis* es frecuentemente difícil de cultivar de pacientes con TB activa, e imposible de cultivar de personas sanas latentemente infectadas. Por lo tanto, una prueba diagnóstica basada en la respuesta inmune, que indique el estado de la infección por el *Mycobacterium tuberculosis* es muy útil en un número de escenarios clínicos que guían el tratamiento, la prevención y el control de esta infección. Por ejemplo, diferenciar entre la infección activa y latente, monitorear la eficacia de la terapia anti-tuberculosis de la TB activa y latente, monitorear la eficacia de vacunas terapéuticas y nuevos fármacos y detectar el progreso temprano para la enfermedad activa.

Los antígenos micobacterianos son conocidos en la materia. Por ejemplo, el antígeno diana de secreción temprana 6 (ESAT-6) y la proteína del filtrado de cultivo 10 (CFP10) son dos antígenos del *Mycobacterium tuberculosis* que se han investigado extensamente en modelos animales y humanos en los últimos años. El ESAT-6 y la CFP10 son dianas fuertes de la respuesta inmune celular en modelos animales, pacientes de tuberculosis y contactos y de ese modo pueden usarse en pruebas de sangre basadas en células T específicas. Los métodos para monitorear las infecciones bacterianas son conocidos de Tsukaguchi y otros, 1915.

30 **Sumario de la invención**

Los presentes inventores mostraron que el perfil de secreción de IL-2 e IFN- γ derivados de las células T correlaciona con diferentes progresos clínicos de la infección por el patógeno intracelular. Así, la descripción proporciona un biomarcador inmunológico indirecto de la carga del patógeno intracelular y el estado *in vivo* el cual puede usarse para predecir, determinar y monitorear el resultado clínico así como monitorear el efecto de la intervención terapéutica o de vacuna en la infección.

Más particularmente, los inventores demostraron que el perfil de citocinas IFN- γ /IL-2 de las células T CD4 específicas al antígeno del patógeno cambia en relación a la carga del antígeno. Durante los estados de alta carga de antígeno, las células T CD4 específicas al antígeno secretan IFN- γ solamente e IFN- γ /IL-2. Durante los estados de baja carga de antígeno, las células T específicas al antígeno dejan de secretar IFN- γ solamente, y secretan IFN- γ /IL-2 predominantemente y nuevamente secretan IL-2 solamente. Este cambio en el perfil de citocinas se observa durante el cambio de una alta carga (enfermedad activa) a una baja carga de antígeno (después de una terapia exitosa).

Correspondientemente, la presente invención proporciona:

- un método para evaluar y/o monitorear una infección micobacteriana, dicho método comprende:
 - (i) contactar una célula T que contiene muestra de dicho individuo con un antígeno micobacteriano;
 - (ii) detectar cualquier célula que secreta IFN- γ y/o IL-2;
 - (iii) determinar si la muestra comprende:
 - (a) células que secretan IFN- γ solamente;
 - (b) células que secretan IL-2 solamente; y/o
 - (c) células que secretan IFN- γ e IL-2,

en donde el perfil de (a), (b) y (c) indican el estado de la infección;

- el uso de un estuche en un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende medios para detectar células que secretan IFN- γ , IL-2 o ambos IFN- γ e IL-2 y un antígeno micobacteriano.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el perfil de citocinas IFN- γ e IL-2 de células T CD4⁺ en la tuberculosis activa y durante y después de la terapia anti-tuberculosis. Los porcentajes mostrados indican las proporciones relativas de células CD4⁺ productoras de IFN- γ e IL-2 en la fracción enriquecida con los niveles de fondo de la producción de citocinas no específicas sustraídos. Las células T CD4⁺ secretoras de IFN- γ /IL-2 e IFN- γ específicas a la CFP-10 y a ESAT-6 co-dominan en la tuberculosis activa, en quienes la carga bacteriana es alta (A,B), mientras que las células T secretoras de IFN- γ /IL-2 predominan durante y después del tratamiento el cual erradicó el bacilo viable, *in vivo*, con la pérdida de las células T CD4⁺ secretoras de IFN- γ solamente y la aparición de células T CD4⁺ secretoras de IL-2 (C, D). Estos datos se observaron reproduciblemente en 4 casos de tuberculosis activa y en 9 muestras de seguimiento de 5 pacientes con 3 meses de tratamiento y después de este.

La Figura 2 muestra la proporción y frecuencia de las respuestas de IFN- γ (barras blancas/símbolos), IFN- γ /IL-2 (barras grises/símbolos) e IL-2 (barras negras/símbolos) de las células T CD4⁺ específicas para ESAT-6 y CFP-10 en la TB activa comparada a los puntos de tiempo de seguimiento (durante y después del tratamiento). Se muestra la proporción de células T CD4⁺ específicas para ESAT-6 y CFP-10 secretoras de IFN- γ y/o IL-2 en la fracción enriquecida (A) y las frecuencias de estas células determinadas después del enriquecimiento magnético de las células secretoras de IFN- γ e IL-2 (B). Las líneas horizontales indican la mediana de la respuesta positiva. Los valores P indican si existe una diferencia estadística entre la TB activa y de seguimiento.

La Figura 3 muestra el perfil de citocinas de IFN- γ e IL-2 de las células T CD4⁺ en la tuberculosis auto-curada. Los PBMC se estimularon con ESAT-6 y CFP-10 y se enriquecieron en células secretoras de IFN- γ e IL-2 como para la Figura 1. Las células T CD4⁺ secretoras de IFN- γ , IFN- γ /IL-2 e IL-2 se observaron en participantes auto-curados en quienes el bacilo viable persiste.

La Figura 4 resume los perfiles de citocinas en diferentes progresos de la infección por tuberculosis.

La Figura 5 muestra las aplicaciones potenciales de esta invención.

Breve descripción de las secuencias

La sec. con núm. de ident.: 1 es la secuencia de aminoácidos del antígeno ESAT-6 del *Mycobacterium tuberculosis*.

La sec. con núm. de ident.: 2 es la secuencia de aminoácidos del antígeno CPF-10 del *Mycobacterium tuberculosis*.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un método para evaluar una infección micobacteriana y/o monitorear una infección micobacteriana en un individuo, que comprende determinar si el individuo tiene (a) células T que secretan IFN- γ solamente, (b) células T que secretan IL-2 solamente o (c) células T que secretan ambas IFN- γ e IL-2 en respuesta a un antígeno del patógeno intracelular y opcionalmente determinar cualquier cambio en este perfil de citocinas.

El patógeno intracelular es un *mycobacterium*. La infección es una infección micobacteriana, tal como *Mycobacterium tuberculosis*.

El método puede usarse para determinar la carga del patógeno, predecir el desarrollo y/o la reactivación de la enfermedad, monitorear la terapia anti-patógeno, evaluar la eficacia de fármacos o vacunas anti-patógeno o para determinar si la terapia anti-patógeno resulta en una cura esterilizante. Por ejemplo, el método puede usarse para determinar y/o monitorear si un paciente tiene una infección activa, una infección latente, una infección o enfermedad que se ha aclarado espontáneamente o se está aclarando, una infección o enfermedad que se ha aclarado o se está aclarando sin intervención médica, o una infección o enfermedad que ha sido o está siendo curada.

Un método de la invención típicamente comprende:

- (i) contactar una célula T que contiene muestra de dicho individuo con un antígeno micobacteriano;
- (ii) detectar cualquier célula que secrete IFN- γ y/o IL-2;
- (iii) determinar si la muestra comprende:

- (a) células que secretan IFN- γ solamente;
- (b) células que secretan IL-2 solamente; y
- (c) células que secretan IFN- γ e IL-2.

El perfil de (a), (b) y (c) indican el estado de la infección.

En un ejemplo, la descripción proporciona un método para determinar la carga del patógeno en un individuo, en

donde la presencia y/o la proporción de (a) correlaciona positivamente con la carga del patógeno y la presencia y/o proporción de (b) correlaciona negativamente con la carga del patógeno del patógeno.

5 El individuo es típicamente un mamífero, preferentemente un ser humano. El ser humano puede tener una infección micobacteriana activa o latente, o puede haber tenido tal infección recientemente. El ser humano puede resultar positivo o negativo en una prueba Mantoux. El ser humano puede estar en riesgo de infección (tal como una infección micobacteriana), típicamente por razones socio-económicas o puede tener una predisposición genética o adquirida para la infección.

10 La infección micobacteriana puede ser causada por cualquier micobacteria. Preferentemente la infección micobacteriana es causada por *Mycobacterium tuberculosis*.

15 El ser humano puede ser un contacto conocido o sospechoso quien se ha expuesto a o puede haber estado expuesto al *Mycobacterium tuberculosis*. Típicamente la exposición es a la tuberculosis pulmonar, tal como la tuberculosis pulmonar "abierta" la cual es esputo A.F.B. (bacilo ácido-rápido) mancha positiva. El contacto puede ser alguien cuya exposición es doméstica, del lugar laboral (tal como un trabajador de cuidados de salud) o una exposición en prisión (tal como un prisionero). La exposición puede ser el resultado de residir en un país con alta prevalencia de TB, y la evaluación diagnóstica después de la emigración a un país con baja prevalencia de TB. Así el contacto puede ser un inmigrante.

20 El ser humano (por ejemplo, quien tiene una exposición conocida o sospechada reciente o remota) puede estar saludable, puede tener una co-infección o una afección crónica o estar en agentes terapéuticos que los ponen en un riesgo más alto de desarrollar la TB activa y/o lo que puede hacer que la infección por TB sea más difícil de diagnosticar. Los ejemplos incluyen individuos infectados con el VIH, individuos que toman inmunosupresores (por ejemplo, corticosteroides, azatioprina y agentes anti-TNF- α , tales como infliximab, y terapia para el cáncer),
25 pacientes en hemodiálisis, receptores de trasplante de órganos, diabéticos y niños muy jóvenes (con edades por debajo de 5 años de edad, particularmente por debajo de 2 años de edad).

30 Las células T que reconocen el antígeno en el método son generalmente células T que han sido pre-sensibilizadas *in vivo* al antígeno del patógeno. Estas células T experimentadas en el antígeno generalmente están presentes en la sangre periférica de un hospedero, el cual se ha expuesto al patógeno, a una frecuencia de 1 en 10^6 a 1 en 10^3 células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células pueden ser células T CD4 y/o CD8.

35 En el método, las células T pueden ser contactadas con el antígeno *in vitro* en una muestra de un individuo.

Generalmente las células T que son contactadas en el método se toman del hospedero en una muestra de sangre, aunque pueden usarse otros tipos de muestras que contienen células T. La muestra puede añadirse directamente al ensayo o puede procesarse primero. Típicamente el procesamiento puede comprender la dilución de la muestra, por ejemplo, con agua, tampón o medio. Típicamente la muestra se diluye de 1.5 a 100 veces, por ejemplo, 2 a 50 o 5 a
40 10 veces.

45 El procesamiento puede comprender la separación de los componentes de la muestra. Típicamente las células mononucleares (MC) se separan de las muestras. Las MC comprenderán las células T y las células presentadoras de antígeno (APC). Así, en el método, las APC presentes en las MC separadas pueden presentar el péptido a las células T. En otra modalidad, solamente células T, tales como solamente células T CD4, pueden purificarse a partir de la muestra. Las PBMC, MC y células T pueden separarse de la muestra usando técnicas conocidas en la materia, tales como aquellas descritas en Lalvani y otros (1997) J.Exp. Med. 186, p859-865.

50 Preferentemente las células T usadas en el ensayo están en forma de muestras no procesadas o diluidas, son células T aisladas en el momento (tal como en forma de MC o PBMC aisladas en el momento) las cuales se usan directamente *ex vivo*, es decir, no se cultivan antes de usarse en el método ni son células descongeladas. Sin embargo, las células T pueden cultivarse antes del uso, por ejemplo, en la presencia del antígeno, y generalmente además de citocinas promotoras del crecimiento exógeno. Durante el cultivo, el antígeno está típicamente presente sobre la superficie de las APC, tales como las APC usadas en el método. El pre-cultivo de las células T puede
55 conllevar a un incremento de la sensibilidad del método. Así las células T pueden convertirse en líneas celulares, tales como líneas celulares de corta duración (por ejemplo, como se describe en Ota y otros (1990) Nature 346, p183-187).

60 La APC que está típicamente presente en el método puede provenir del mismo hospedero de las células T o de un hospedero diferente. La APC puede ser una APC de origen natural o una APC artificial. La APC es una célula capaz de presentar el antígeno a una célula T. Esta es típicamente una célula B, célula dendrítica o macrófago. Típicamente se separa de la misma muestra que la célula T y típicamente se co-purifica con la célula T. Así, la APC puede estar presente en las MC o PBMC. La APC es típicamente una célula aislada en el momento *ex vivo* o una

célula cultivada. Puede estar en forma de una línea celular, tal como una línea celular de corta duración o inmortalizada. La APC puede expresar moléculas MHC clase II vacías sobre su superficie.

En un ejemplo, el antígeno se añade a un ensayo que comprende células T y APC. Por ejemplo, el antígeno puede estar recubierto por la parte interna del contenedor, por ejemplo, un tubo dentro del cual la sangre se drena del paciente; alternatively, el antígeno puede añadirse a un contenedor que ya contiene células T y APC. Como se discutió anteriormente las células T y las APC en tal ensayo pueden estar en forma de MC. Cuando se usa un antígeno que puede ser reconocido por la célula T sin necesidad de presentación por las APC entonces no se requieren las APC. Los análogos que simulan el antígeno original unido a una molécula MHC son un ejemplo de tal antígeno.

En un ejemplo, el antígeno se proporciona a la APC en ausencia de la célula T. La APC se proporciona después a la célula T, típicamente después que se deja presentar el antígeno sobre su superficie. El antígeno puede haber sido tomado dentro de la APC y presentado, o simplemente tomarse sobre la superficie sin entrar en el interior de la APC.

Típicamente se añaden a cada ensayo 10^5 a 10^7 , preferentemente 2.5×10^5 a 10^6 de PBMC. En el caso cuando el péptido se añade directamente al ensayo su concentración es de 10^{-1} a $10^3 \mu\text{g/ml}$, preferentemente 0.5 a $50 \mu\text{g/ml}$ o 1 a $10 \mu\text{g/ml}$.

Típicamente la longitud de tiempo para que las células T se incuben con el antígeno es de 4 a 24 horas (preferentemente de 5 a 18 horas) para las células T efectoras o más de 24 horas para las células de memoria central. Se encontró que cuando se usan PBMC *ex vivo* pueden incubarse 5.0×10^6 PBMC en $10 \mu\text{g/ml}$ de péptido por 5 horas a 37°C .

Cualquier antígeno adecuado puede usarse en un método de la invención. Típicamente el antígeno es un antígeno micobacteriano o *M. tuberculosis*. El antígeno puede estar en forma de una proteína de origen natural que es reconocida por una célula T. Los antígenos de *M. tuberculosis* adecuados incluyen ESAT-6 y CFP-10. Las secuencias de aminoácidos de estos antígenos se muestran en las sec. con núms. de ident.: 1 y 2, respectivamente.

El antígeno puede ser un fragmento (tal como un péptido) y/o un homólogo de una proteína de origen natural la cual es reconocida por una célula T que reconoce la secuencia del epítipo de la célula T natural. El antígeno puede ser además un análogo que simula el epítipo de la proteína de origen natural unido a una molécula MHC.

La IL-2 o el IFN- γ pueden detectarse típicamente permitiéndoles unirse a un agente de captura específico el cual puede inmovilizarse sobre un soporte tal como una placa, glóbulo, o la célula secretora de la citocina en sí misma, y después medir la presencia del complejo agente de unión específico /IL-2 y/o el complejo agente de unión específico/IFN- γ típicamente con un segundo agente de detección de la unión. Se puede incorporar un paso de lavado para eliminar el material que no está específicamente unido al agente de captura.

Típicamente el segundo agente se une al IFN- γ o a la IL-2 en un sitio diferente del sitio al cual se une al primer agente. El segundo agente puede estar directamente conjugado a una enzima tal como la fosfatasa alcalina, o un marcador fluorescente o puede comprender una porción de biotina para detectarse por un tercer agente que comprende estreptavidina, la cual está directamente conjugada a una enzima o a un marcador fluorescente. Después, la enzima conjugada cambia el color de un reactivo. El agente es preferentemente un anticuerpo, mono- o policlonal. Los anticuerpos para la IL-2 y el IFN- γ están disponibles comercialmente, o pueden fabricarse usando técnicas estándares.

El método preferido empleado para detectar IFN- γ y/o IL-2 estarán basados en inmunoensayos sandwich que detectan la frecuencia de las células secretoras de citocina tales como ELISpot fluorescente o de color, ensayos de dilución limitada, ensayos de tinción intracelular de citocinas y de secreción de citocinas con o sin enriquecimiento de las células secretoras de la citocina como las pioneras de Miltenyi Biotec. Alternativamente, la cantidad de citocina secretada puede medirse, por ejemplo, por un sistema basado en ELISA tal como el sistema Quantiferon® de sangre total con el anticuerpo de captura inmovilizado sobre una placa, y sus modificaciones (por ejemplo, como el disponible de Cellestis) o la tecnología de matriz de suspensión Luminex® usando estuches Beadlyte® con el anticuerpo de captura inmovilizado sobre un glóbulo. La expresión del ARNm de la citocina puede medirse además con ensayos tales como RT-PCR.

En un ejemplo, el sistema de detección que se usa es el ensayo ELISpot *ex-vivo* descrito en documento WO 98/23960. En ese ensayo el IFN- γ secretado de la célula T se une a un primer anticuerpo específico para IFN- γ que está inmovilizado sobre un soporte sólido. El IFN- γ unido se detecta después usando un segundo anticuerpo específico para IFN- γ el cual está marcado con un marcador detectable. Tal anticuerpo marcado puede obtenerse de MABTECH (Estocolmo, Suecia). Otros marcadores detectables que pueden usarse se discuten más abajo.

Los métodos de la invención permiten determinar si las células T respondedoras al antígeno del patógeno que producen IFN- γ , IL-2 o ambos IFN- γ e IL-2 están presentes en un individuo. Además, las cantidades relativas de cada tipo de célula T respondedora al antígeno pueden determinarse. La presencia o ausencia de cada tipo de célula T permite determinar el estado de la infección en el individuo y/o la carga micobacteriana.

La presencia de células secretoras de IFN- γ solamente y células que secretan IFN- γ e IL-2 ocurren durante los estados de alta carga de antígeno. Durante los estados de baja carga del antígeno, las células T específicas de antígeno dejan de secretar IFN- γ solamente, secretan predominantemente IFN- γ e IL-2 y nuevamente secretan IL-2 solamente. Así, las células secretoras de IFN- γ solamente se correlacionan positivamente con la carga del antígeno y las células secretoras de IFN- γ /IL-2 se correlacionan negativamente con la carga del antígeno. El perfil de los tres tipos de células T respondedoras al antígeno puede usarse para determinar la carga de patógeno en el individuo.

Cuando el individuo tiene una infección micobacteriana latente, pero no muestra síntomas de enfermedad, evaluar y/o monitorear el perfil de células secretoras de IFN- γ , IL-2 e IL-2/IFN- γ será predictivo del riesgo de reactivación. La presencia de células secretoras de IFN- γ solamente o IFN- γ /IL-2 típicamente indica que el individuo tiene una infección latente asociada con un riesgo de progresión hacia tuberculosis activa. El número o proporción de células T secretoras de IFN- γ solamente pueden correlacionar positivamente con el riesgo de progresión o reactivación, el cual está fuertemente influenciado además por numerosos factores del hospedero que incluyen, por ejemplo, pero sin limitarse a, edad, enfermedades concomitantes, co-infección con VIH, inmunosupresión iatrogénica y cuán reciente es la infección. Contrariamente, el número o proporción de las células secretoras de IL-2 solamente, con o sin presencia de células secretoras de IFN- γ e IL-2, puede correlacionar inversamente con el riesgo de progresión o reactivación y un número relativamente alto de células secretoras de IL-2 puede indicar un riesgo muy bajo de reactivación.

El método puede usarse para monitorear el progreso de la terapia anti-patógeno (preferentemente mycobacterium) en la infección activa o latente de un individuo. Una disminución en el número de (o cantidad relativa de) células secretoras de IFN- γ solamente y/o un incremento en el número de (o cantidad relativa de) células secretoras de IL-2 indican que la terapia es efectiva. Similarmente, un incremento en la predominancia de las células que secretan ambas IFN- γ e IL-2 es una indicación que la terapia está funcionando.

El método puede usarse para evaluar la eficacia de fármacos anti-apatógenos conocidos o vacunas o para probar la eficacia de nuevos fármacos anti-patógenos potenciales o vacunas. En un individuo que tiene una infección por patógeno, una disminución en el número de (o cantidad relativa de) células secretoras de IFN- γ solamente y/o un incremento en el número de (o cantidad relativa de) células secretoras de IL-2 indican que la terapia es eficaz. Igualmente, un incremento en la predominancia de las células que secretan IFN- γ e IL-2 es también una indicación positiva de eficacia.

En la evaluación de una vacuna, el perfil de los tres tipos de células respondedoras al antígeno puede examinarse después de la infección para determinar la efectividad de la vacuna. Típicamente un perfil asociado con baja carga del patógeno indica que la vacuna es efectiva y un perfil asociado a una alta carga del patógeno es menos prometedor.

Así, el individuo evaluado en un método puede haber recibido un fármaco anti-patógeno o una vacuna. El método puede comprender además la comparación del estado de dicha infección con el estado de dicha infección en dicho individuo determinado previamente, monitoreando de ese modo la efectividad de dicho fármaco anti-patógeno o vacuna en dicho individuo.

Alternativamente, el individuo puede haber recibido un fármaco anti-patógeno de prueba o vacuna. En este ejemplo, el método puede comprender además la comparación del estado de dicha infección con el estado de dicha infección en dicho individuo determinado previamente, determinando de ese modo la eficacia de dicho fármaco de prueba o vacuna.

La descripción proporciona además un estuche para llevar a cabo los métodos de la invención que comprende medios para detectar células que secretan IFN- γ , IL-2 o las dos IFN- γ e IL-2 en respuesta a un antígeno de un patógeno (preferentemente micobacteriano). El estuche puede incluir opcionalmente las instrucciones para correlacionar el perfil de células secretoras de IFN- γ , IL-2 y/o IFN- γ e IL-2 con el estado de la infección. Por ejemplo, las instrucciones pueden ser para correlacionar la detección de las células secretoras de IFN- γ , IL-2 y/o IFN- γ e IL-2 con la carga del patógeno.

Típicamente los medios para detectar el reconocimiento permite o ayuda a la detección en las técnicas discutidas anteriormente. Así los medios pueden permitir la detección de IFN- γ e IL-2 secretadas por las células T después del reconocimiento. Así, el estuche puede incluir adicionalmente un agente de unión específico para cada uno de IFN- γ

e IL-2, tal como un anticuerpo. El agente se inmoviliza típicamente en un soporte sólido. Esto significa que después de la unión del agente el IFN- γ y/o la IL-2 permanecerán en el área adyacente de la célula T que la secretó. Así se forman "puntos" del complejo IFN- γ /agente y/o IL-2 /agente en el soporte, donde cada punto representa una célula T que está secretando IFN- γ y/o IL-2. La cuantificación de los puntos, y típicamente la comparación contra un control, permite determinar los números relativos de células que secretan IFN- γ , IL-2 o ambas IFN- γ e IL-2.

El estuche puede comprender además un medio para detectar los complejos IFN- γ /agente y/o IL-2/agente. Un cambio detectable puede ocurrir en el agente en sí mismo luego de la unión de IFN- γ y/o IL-2, tal como un cambio de color. Alternativamente, un segundo agente marcado directa o indirectamente para la detección, puede permitir la unión del complejo IFN- γ /agente y/o IL-2 /agente para permitir la determinación de los puntos. Como se discutió anteriormente, el segundo agente puede ser específico para IFN- γ o IL-2, pero se une a un sitio diferente sobre el IFN- γ o la IL-2 respecto al primer agente.

El soporte inmovilizado puede ser una placa con pocillos, tal como una placa de microtitulación. Cada ensayo puede, por lo tanto, llevarse a cabo en un pocillo separado en la placa.

El estuche puede comprender además el medio para las células T, los agentes de detección o los tampones de lavado para usarse en las etapas de detección. El estuche puede comprender además reactivos adecuados para la separación de la muestra, tal como la separación de PBMC o células T de la muestra. El estuche puede diseñarse para permitir la detección de las células T directamente en la muestra sin requerir ninguna separación de los componentes de la muestra.

El estuche puede comprender además controles, tales como controles positivos o negativos. El control positivo puede permitir que el sistema de detección sea probado. Así el control positivo típicamente simula el reconocimiento del péptido en cualquiera de los métodos anteriores. Típicamente en los estuches diseñados para determinar el reconocimiento *in vitro* el control positivo es IFN- γ y/o IL-2.

El estuche puede comprender además un medio para tomar una muestra que contiene las células T del humano, tal como una muestra de sangre. El estuche puede comprender un medio para separar células mononucleares o células T de una muestra de un individuo.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Perfil de citocinas IFN- γ e IL-2 de células T CD4+ en la tuberculosis activa y durante y después de la terapia anti-tuberculosis

Las PBMC congeladas se estimularon con mezclas de péptidos ESAT-6 o CFP-10 específicos de *M. tuberculosis* (15-mers solapados por 10 aminoácidos) por 5 h a 37°C. El IFN- γ y la IL-2 secretados después se capturaron sobre la superficie de la célula secretora por 45 min a 37°C seguido por un enriquecimiento de células positivas para IFN- γ e IL-2 con los estuches de detección y de enriquecimiento de célula IFN- γ (APC) e IL-2 (PE) de acuerdo con el fabricante (Miltenyi Biotec Ltd). Las PBMC se tiñeron con anticuerpos anti-CD4, anti-IFN- γ , anti-IL-2, y anticuerpos anti-CD14 conjugado a PerCP, anti-CD19 conjugado a PerCP para excluir monocitos y células B, respectivamente, y con Vía-Probe para excluir células muertas. Los gráficos se restringieron a la ventana de las células CD4+ CD14- CD 19- Vía-Probe.

Los resultados se muestran en la Figura 1. Las células T CD4+ secretoras de IFN- γ e IFN- γ /IL-2 específicas para ESAT-6 y CFP-10 co-dominaron en individuos con tuberculosis activa, en quienes la carga bacteriana es alta (Figura 1A y B). En contraste, las células T secretoras de IFN- γ /IL-2 predominaron durante y después del tratamiento que erradicó el bacilo viable *in vivo*, con la pérdida de las células T CD4+ secretoras de IFN- γ solamente y la aparición de células T CD4+ secretoras de IL-2 (Figura 1C y D). Estos datos se observaron reproduciblemente en 4 casos de tuberculosis activa y en 9 muestras de seguimiento de 5 pacientes con 3 meses de tratamiento y después de este.

Los mismos resultados se muestran además en la Figura 2 donde las proporciones relativas y las frecuencias de las células T CD4+ secretoras de IFN- γ e IFN- γ /IL-2 específicas para ESAT-6 y CFP-10 se comparan entre las muestras de pacientes con tuberculosis activa antes del inicio del tratamiento con muestras después del inicio del tratamiento. La proporción relativa e igualmente la frecuencia absoluta de las células T CD4+ secretoras de IFN- γ solamente específicas para ESAT-6 y CFP-10 fueron mayores en la tuberculosis activa no tratada comparada con el seguimiento durante y después del tratamiento, mientras que la proporción relativa de las células T CD4+ secretoras de IL-2 solamente específicas para ESAT-6 y CFP-10 fue mayor durante el seguimiento comparada a la tuberculosis activa no tratada.

Ejemplo 2: Perfil de citocinas IFN- γ e IL-2 de células T CD4+ en tuberculosis auto-curada

Las PBMC se estimularon con ESAT-6 y CFP-10 y se enriquecieron para células secretoras de IFN- γ e IL-2 como se describió en el Ejemplo 1. Las células T CD4+ secretoras de IFN- γ , IFN- γ /IL-2 e IL-2 se observaron en participantes auto-curados en quienes el bacilo viable persiste. Los participantes auto-curados son un grupo con riesgo de reactivación de la enfermedad.

Listado de Secuencia

10 <110> Isis Innovation Limited
 <120> Correlato Clínico
 <130> N.97216 SER/SA
 15 <140>
 <141>
 <160> 2
 20 <170> PatentIn versión 3.2
 <210> 1
 <211> 95
 25 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 1
 Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser
 1 5 10 15
 Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly
 20 25 30
 Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser
 35 40 45
 Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu
 50 55 60
 Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala
 85 90 95
 30 <210> 2
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 35 <400> 2
 Met Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 Asn Phe Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp Gln Val
 20 25 30

ES 2 423 479 T3

Glu Ser Thr Ala Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly Ala Ala Gly
 35 40 45

Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala Asn Lys
 50 55 60

Gln Lys Gln Glu Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn Ile Arg Gln Ala Gly
 65 70 75 80

Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ser
 85 90 95

Gln Met Gly Phe
 100

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar y/o monitorear una infección micobacteriana, dicho método comprende:
 - (i) contactar una célula T que contiene muestra de dicho individuo con un antígeno micobacteriano;
 - (ii) detectar cualquier célula que secrete IFN- γ y/o IL-2;
 - (iii) determinar si la muestra comprende:
 - (a) células que secretan IFN- γ solamente;
 - (b) células que secretan IL-2 solamente; y
 - (c) células que secretan IFN- γ e IL-2,

en donde el perfil de (a), (b) y (c) indican el estado de la infección.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho individuo recibió: un fármaco o vacuna que trata dicha infección; o un fármaco de prueba o vacuna.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además comparar el estado de dicha infección con el estado de dicha infección en dicho individuo determinado previamente, y de ese modo: monitorear la efectividad de dicho fármaco o vacuna en dicho individuo; o determinar la eficacia de dicho fármaco de prueba o vacuna.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha infección es una infección por *Mycobacterium tuberculosis*.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho individuo tiene una enfermedad por TB activa o una infección de tuberculosis latente (LTBI).
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho individuo se recuperó de la tuberculosis (TB) y dicho método comprende además determinar la probabilidad de la reactivación, en donde la probabilidad de la reactivación se correlaciona positivamente con la carga micobacteriana.
7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho individuo está en riesgo de contraer dicha infección.
8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el individuo es un niño pequeño y/o está inmunocomprometido.
9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el método de monitoreo se lleva a cabo en múltiples intervalos de tiempo para determinar un cambio en el estado de la infección.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el método de monitoreo se lleva a cabo al menos 3 a 20, preferentemente 6 a 10 veces, y/o se lleva a cabo al menos cada 40 días y/o por la duración del período de riesgo de reactivación y/o se lleva a cabo para determinar si la tuberculosis latente se está haciendo activa.
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el antígeno es ESAT-6 o CFP-10.
12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el antígeno es un fragmento u homólogo de una proteína de origen natural la cual es reconocida por una célula T la cual reconoce una secuencia de epítipo de célula T natural en la proteína.
13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde (a), (b) y (c) se detectan usando anticuerpos inmovilizados para IFN- γ e IL-2.
14. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende determinar la carga de patógeno en un individuo, en donde la presencia de (a) correlaciona positivamente con la carga del patógeno y la presencia de (b) correlaciona negativamente con la carga del patógeno del patógeno.

15. El uso en un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes de un estuche que comprende: medios para detectar células que secretan IFN- γ , IL-2 o IFN- γ e IL-2; y un antígeno micobacteriano.

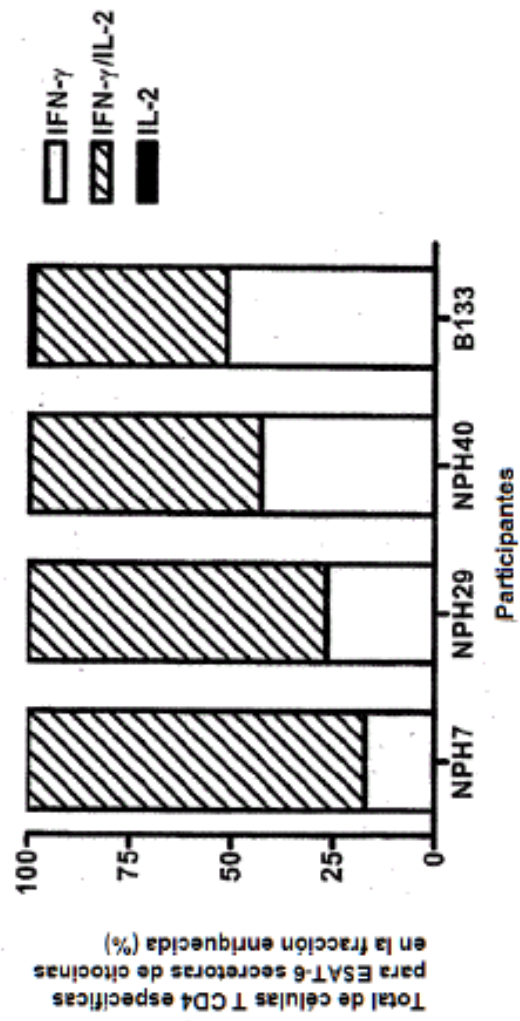


Figura 1A

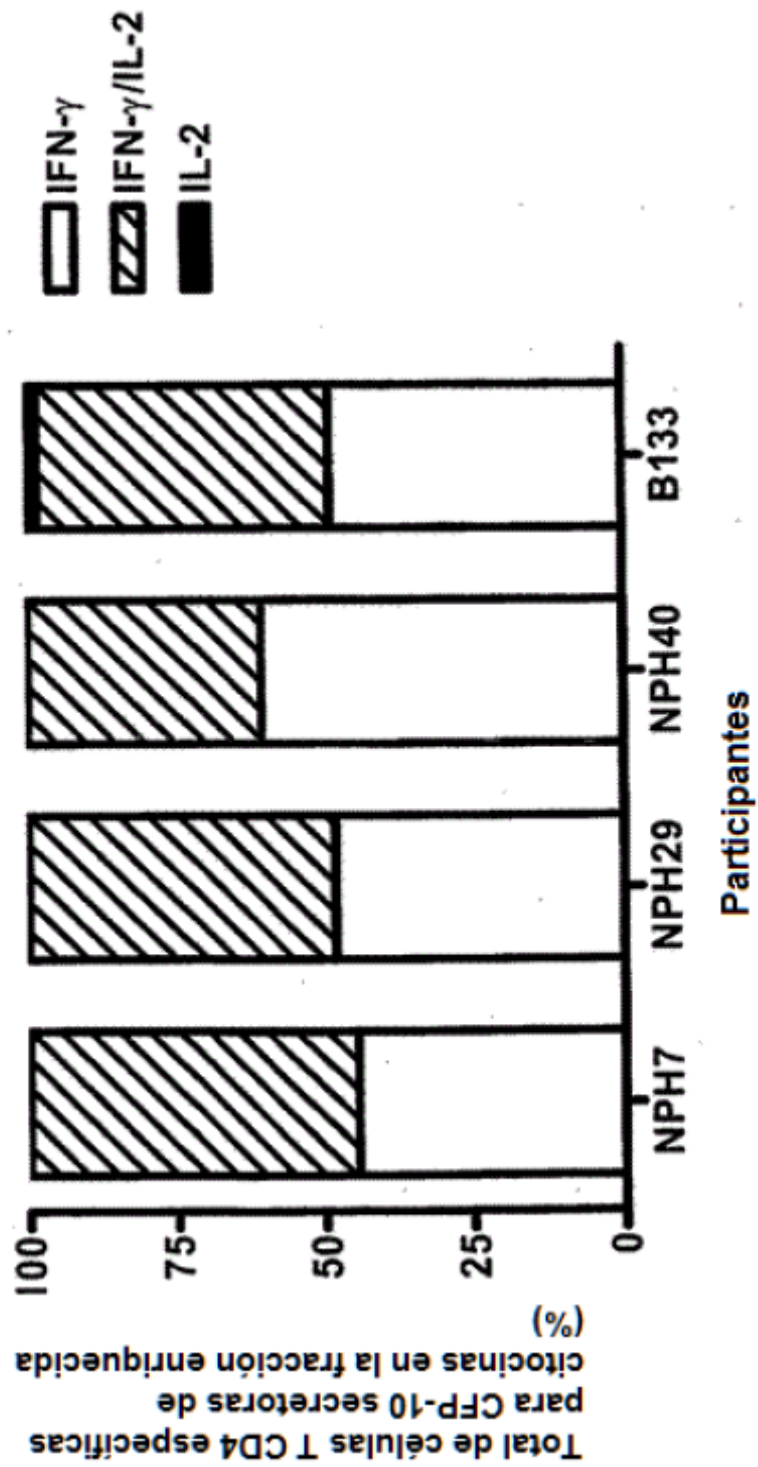


Figura 1B

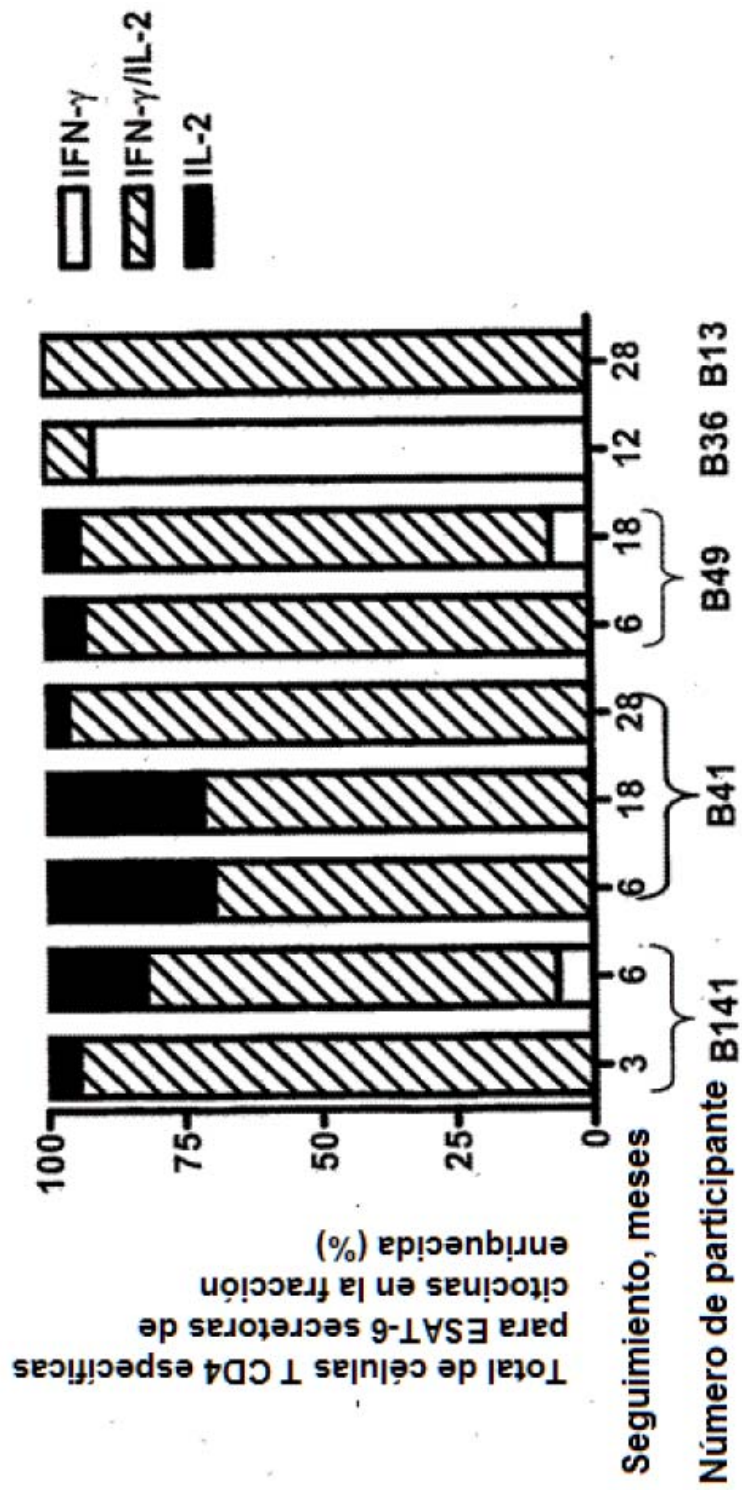


Figura 1C

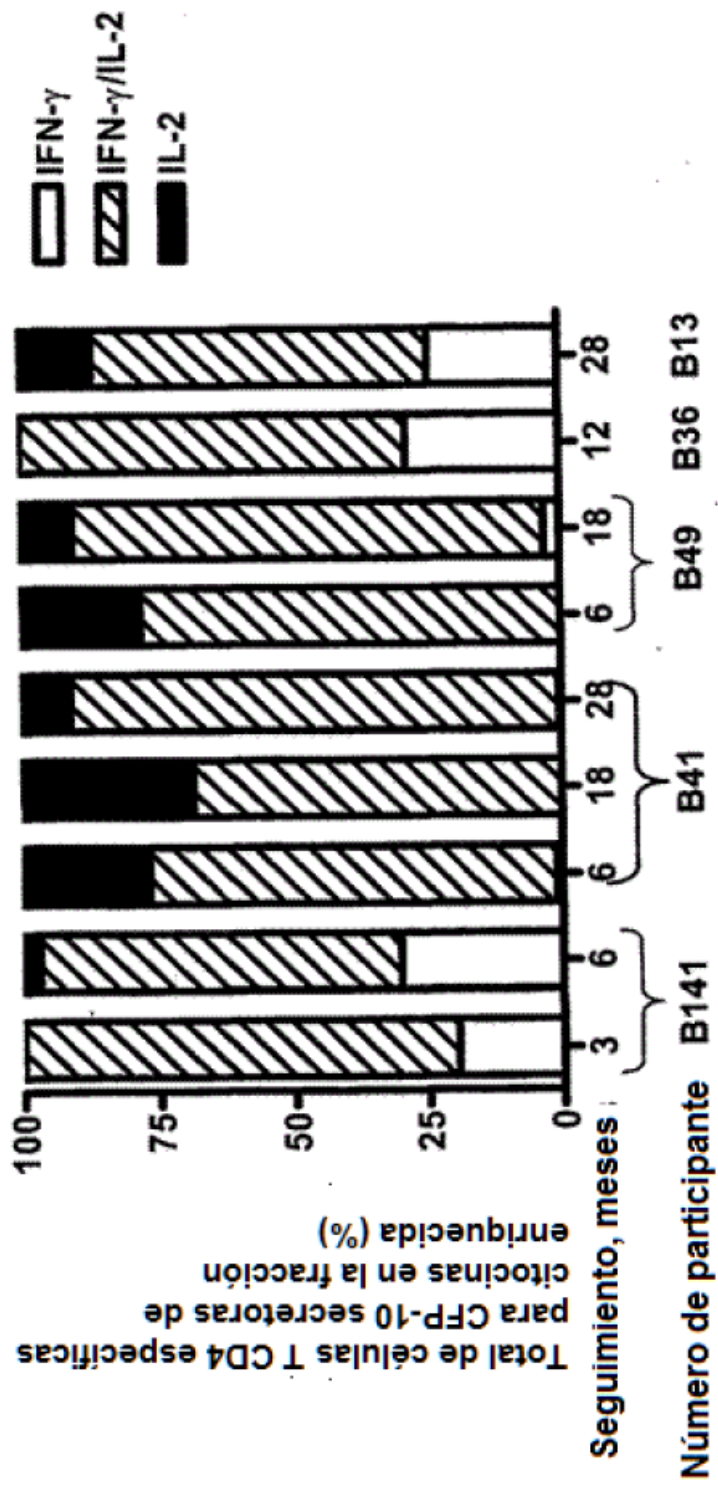


Figura 1D

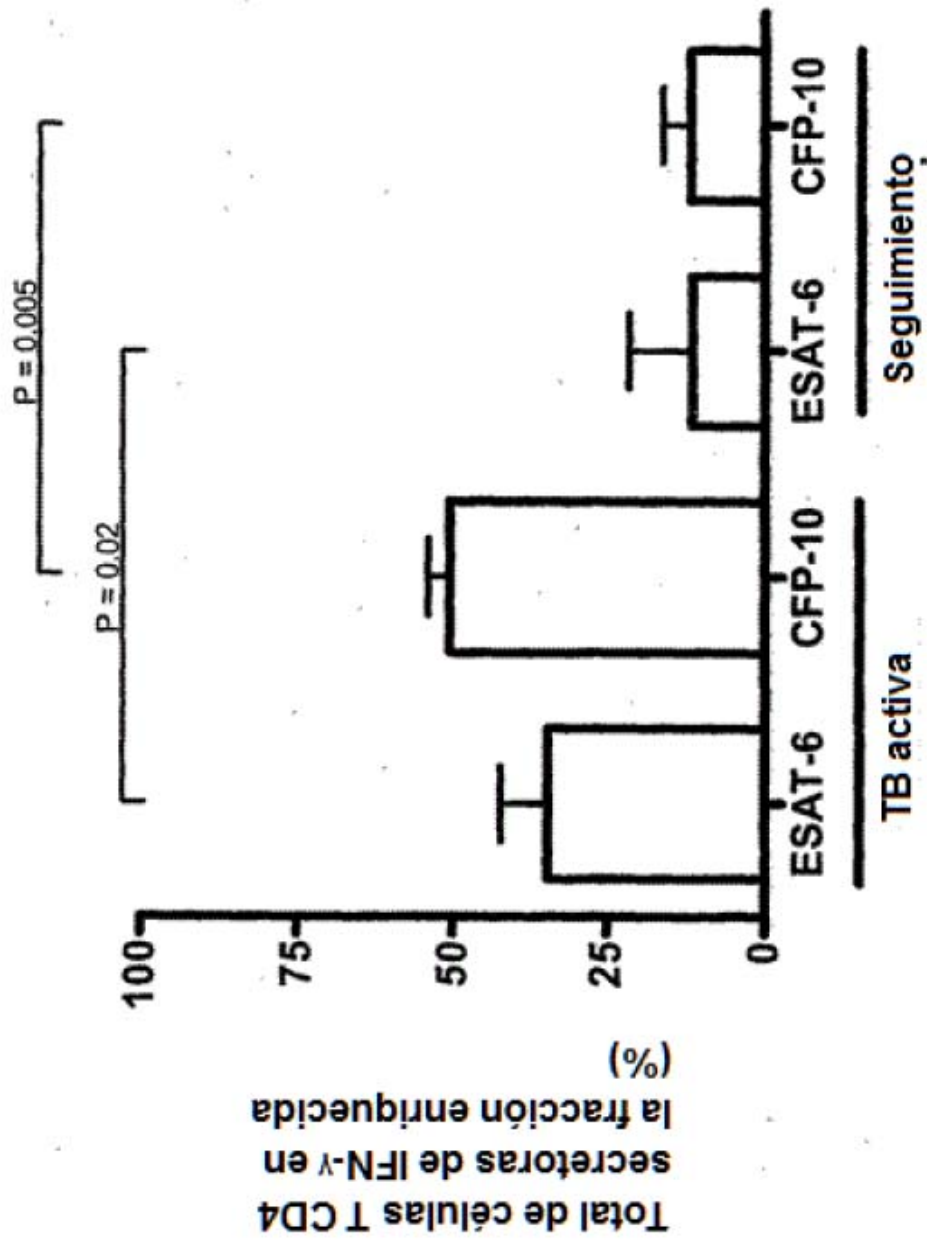


Figura 2A(i)

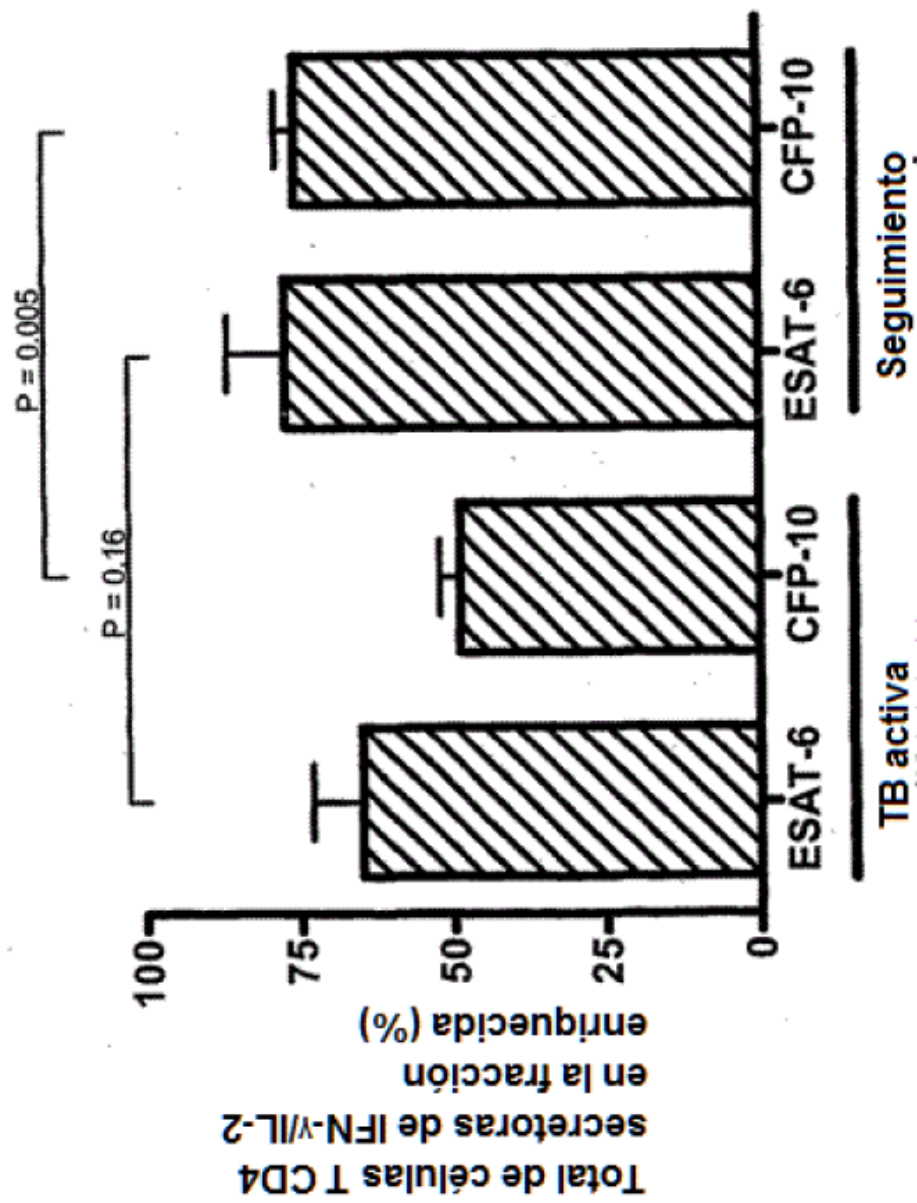


Figura 2A(ii)

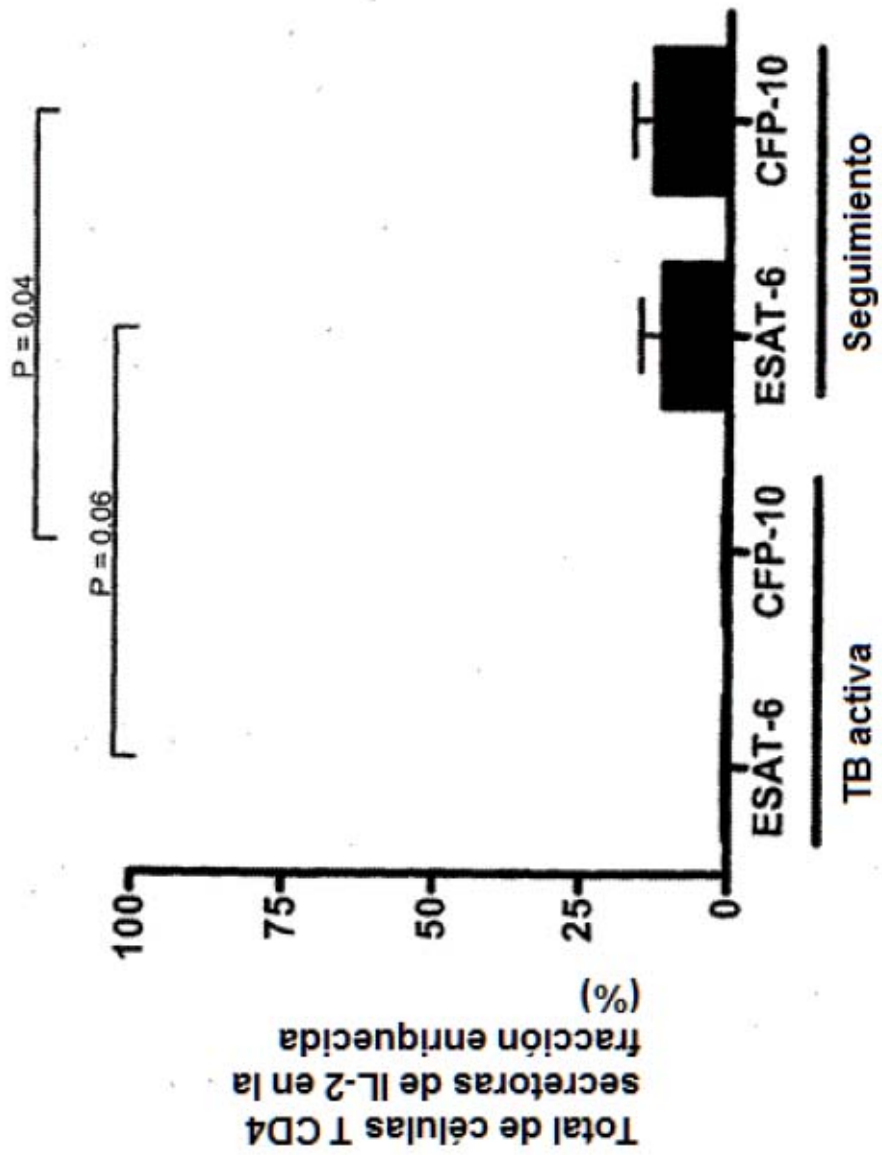


Figura 2A(iii)

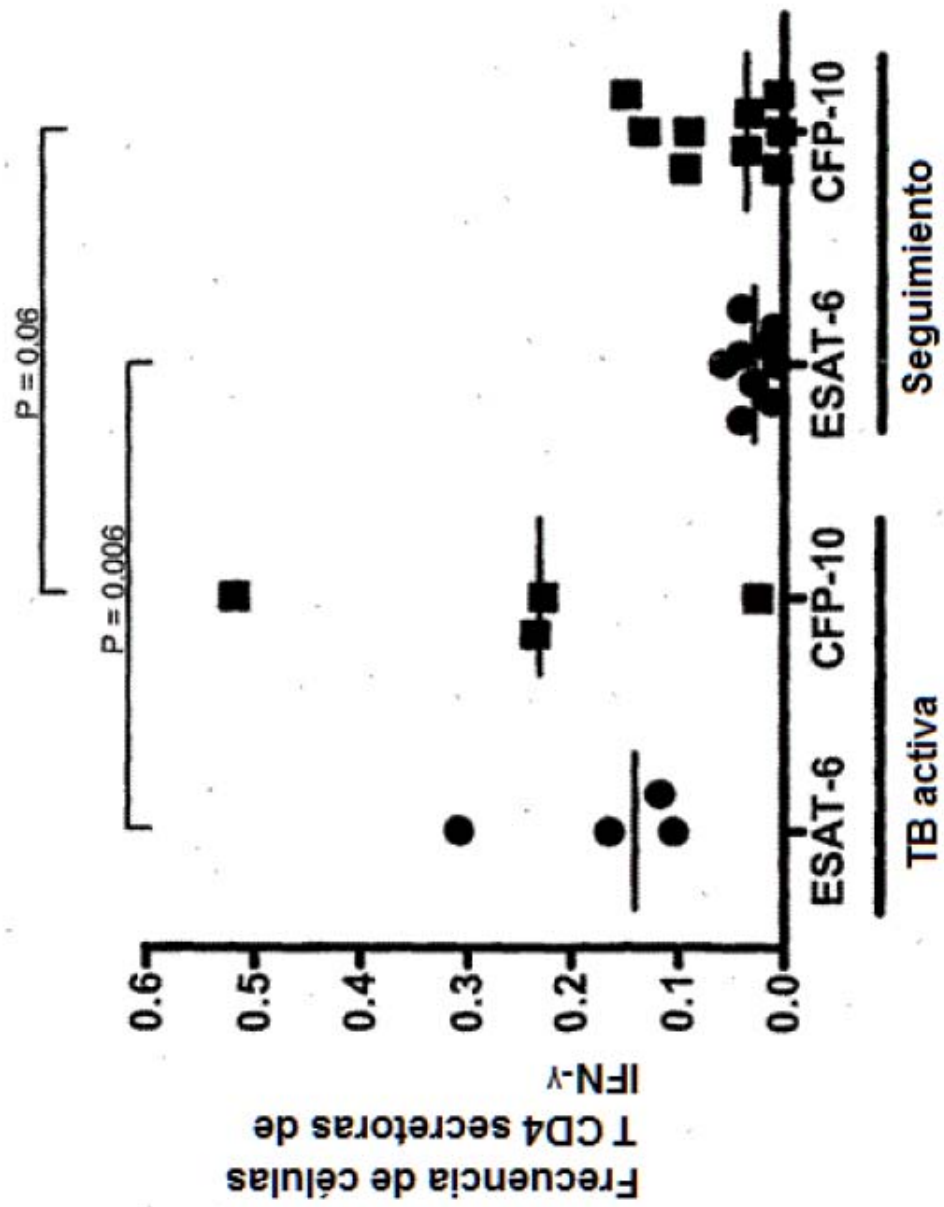


Figura 2B(i)

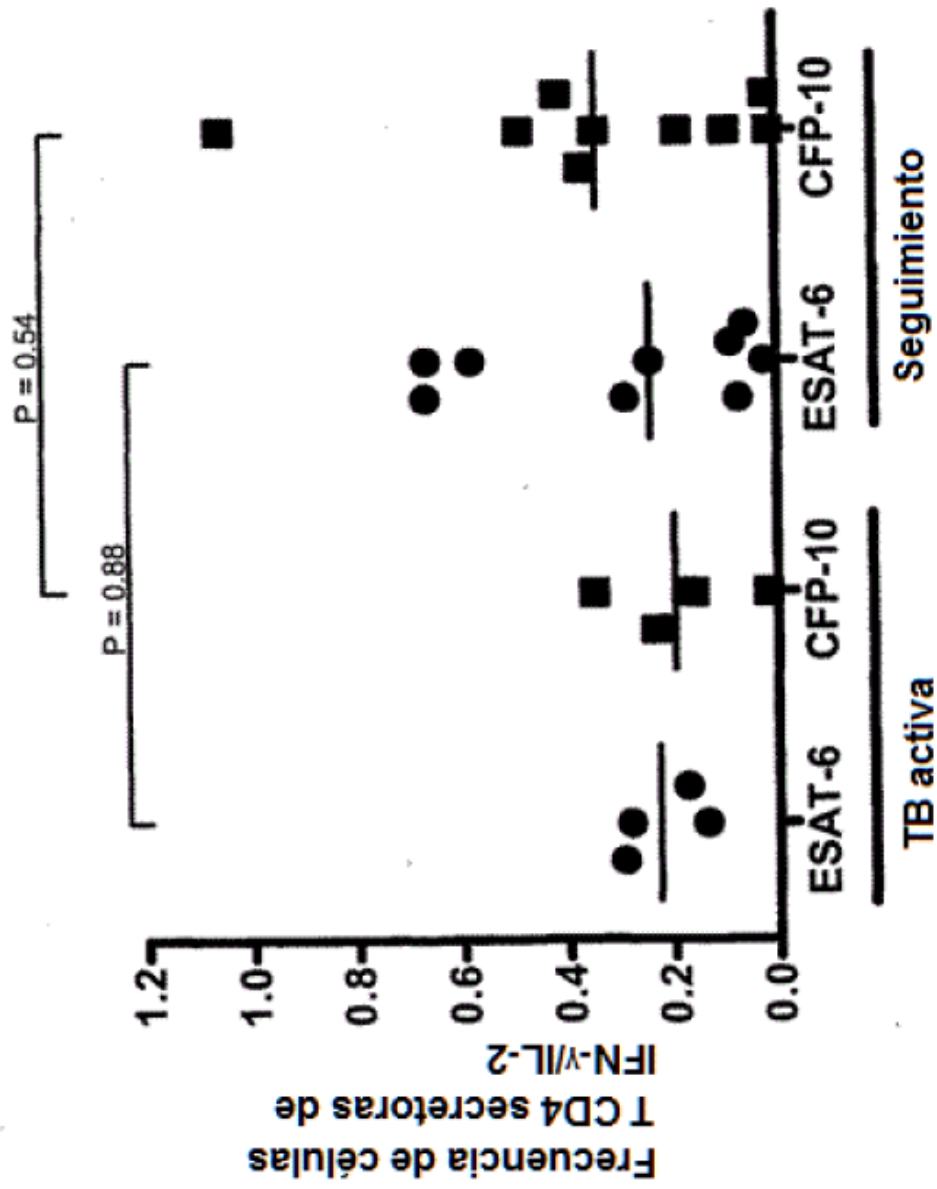


Figura 2B(ii)

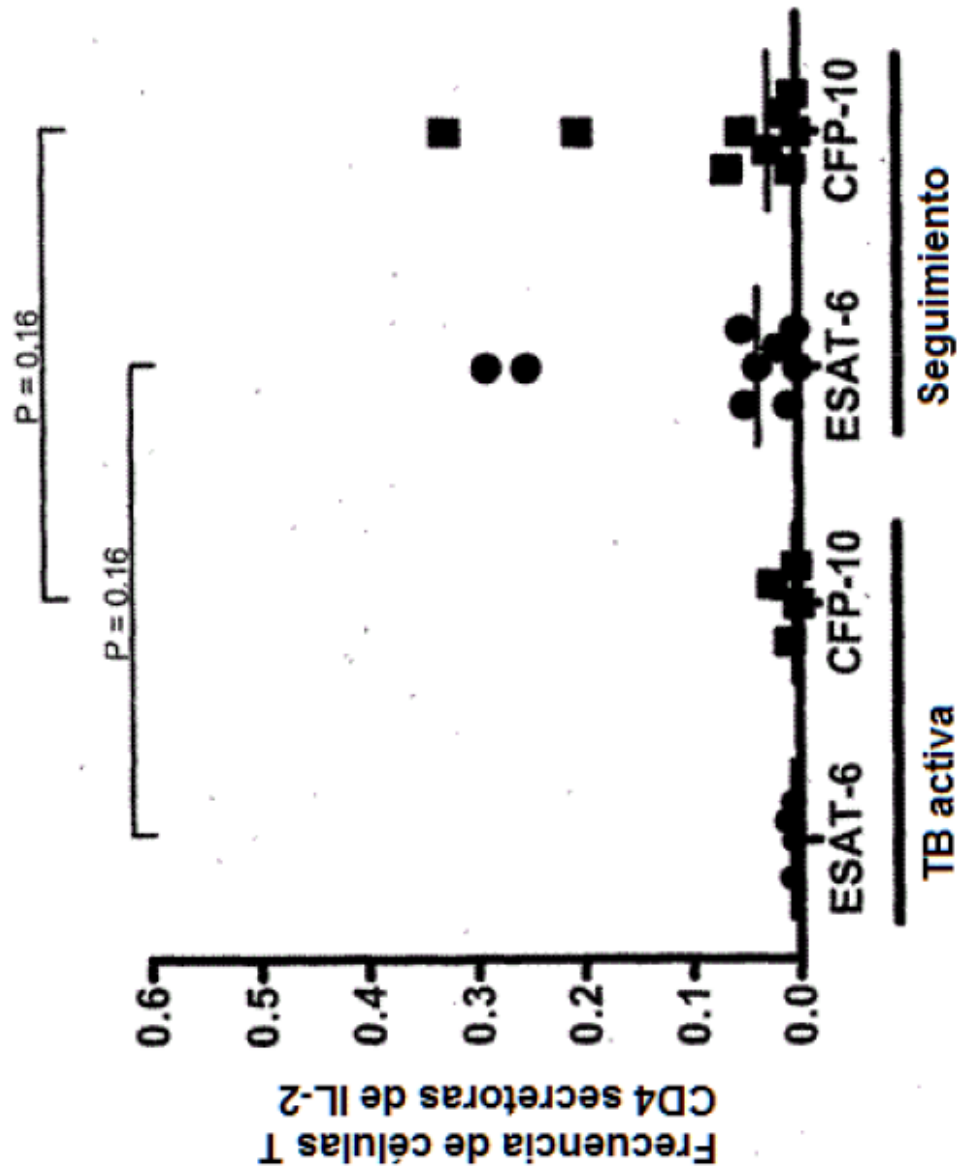


Figura 2B(iii)

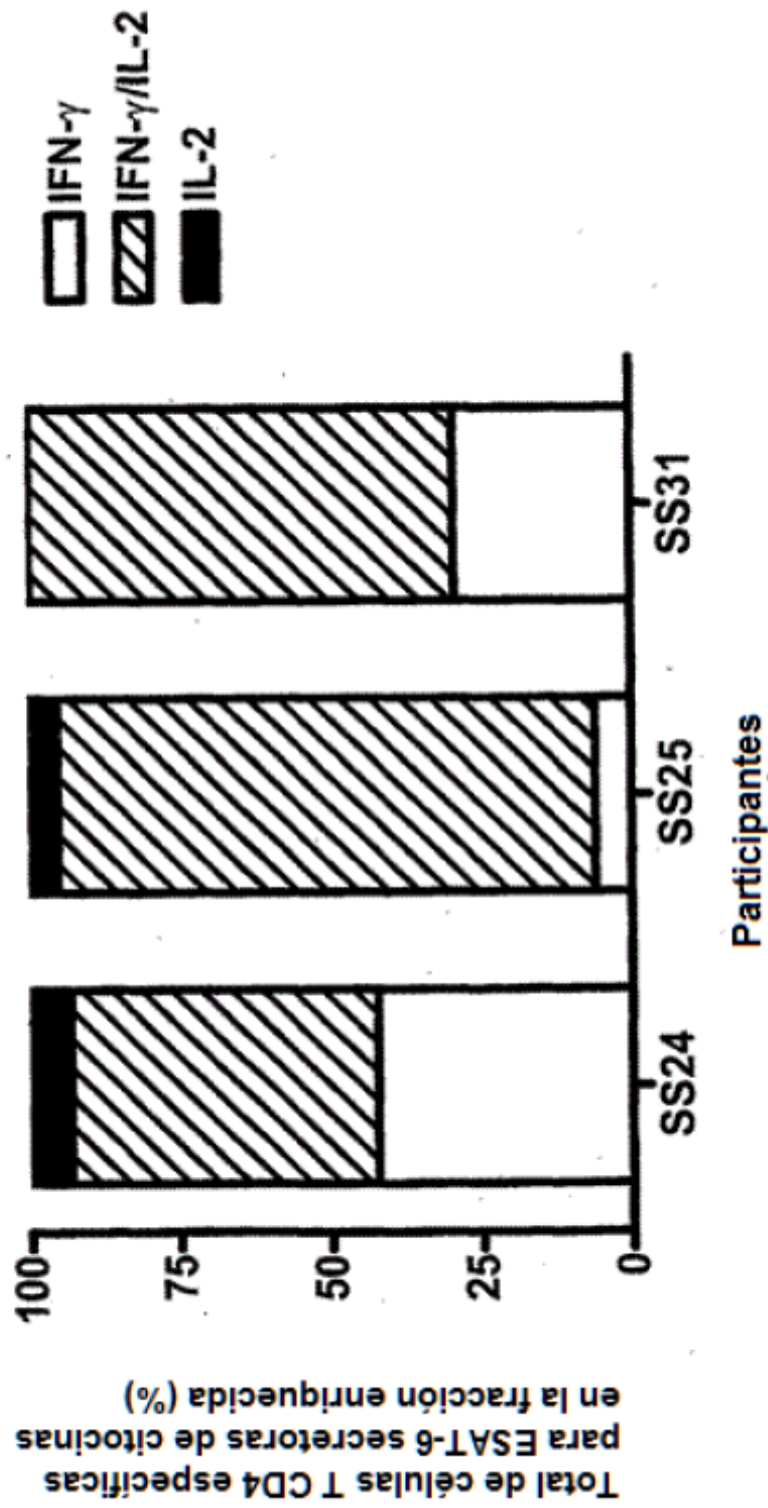


Figura 3A

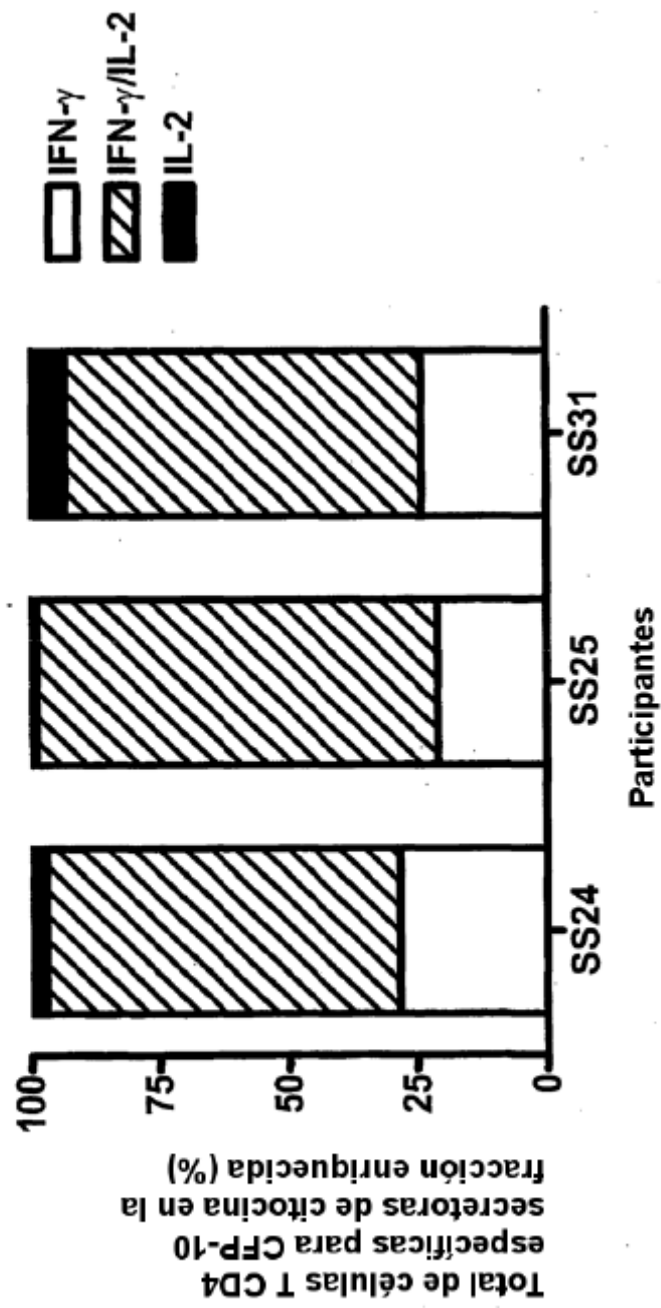


Figura 3B

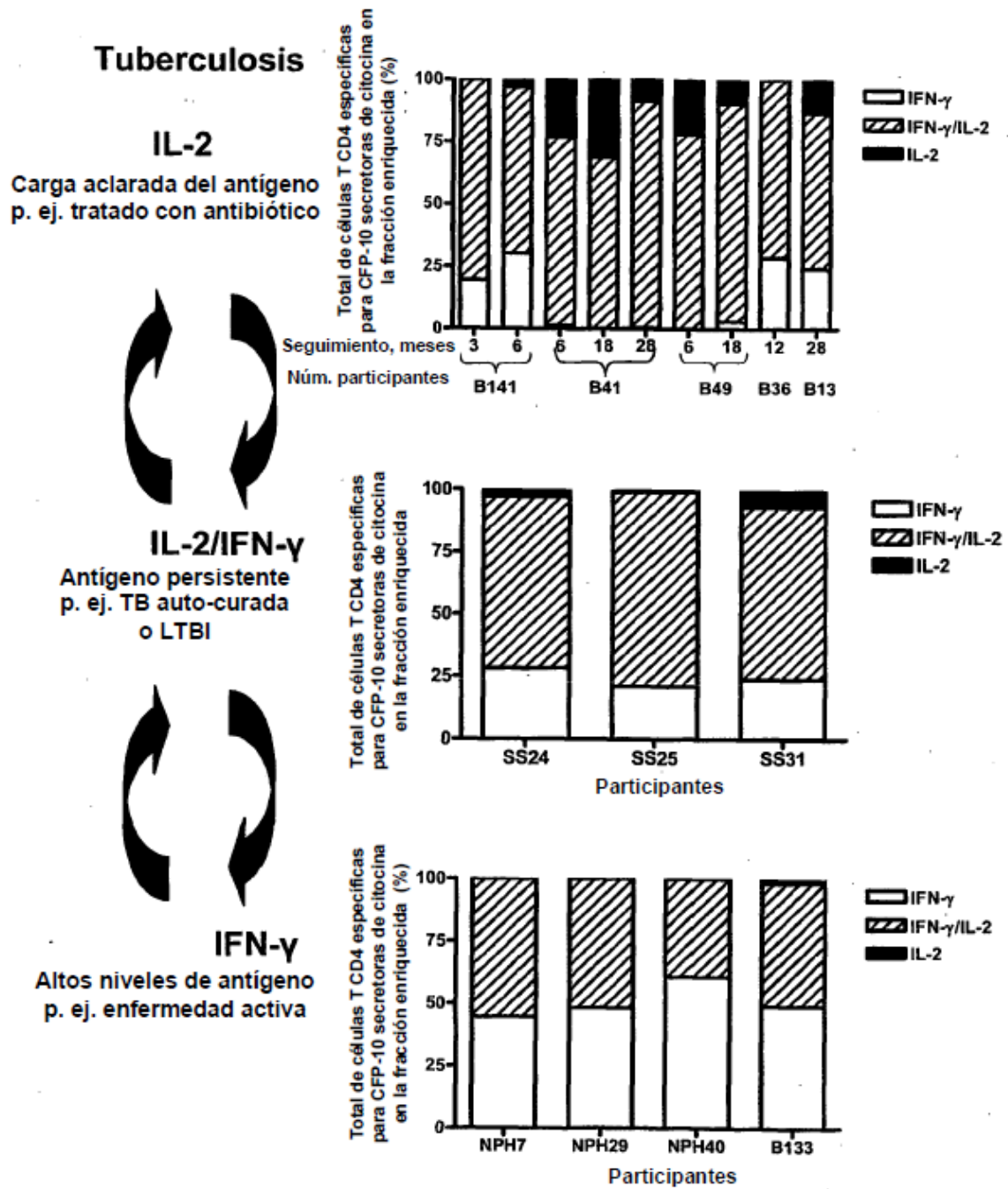


Figura 4

Fig. 5

