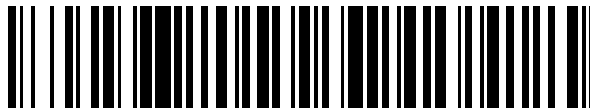


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 543**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2008 E 08714423 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2132569**

54 Título: **Un ensayo de respuesta inmunitaria mediada por células y kits para el mismo**

30 Prioridad:

16.03.2007 AU 2007901385 P

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

05.02.2016

73 Titular/es:

**CELLESTIS LIMITED (100.0%)
Office Tower 2, Chadstone Centre, P.O. Box 169,
1341 Dandenong Road
Chadstone, Victoria 3148, AU**

72 Inventor/es:

**RADFORD, ANTHONY, J.;
JONES, STEPHEN, L. y
HOWARD, JENNY, L.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 558 543 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

Un ensayo de respuesta inmunitaria mediada por células y kits para el mismo

5 **Campo**

La presente invención se refiere generalmente a métodos y kits para su uso en el diagnóstico, monitorización o tratamiento que miden la sensibilidad celular a un agente *in vitro*. En particular, la presente invención proporciona un sistema para medir una respuesta inmunitaria mediada por células (CMI, *Cell-Mediated Immune*) contra un antígeno en una pequeña muestra de sangre completa recogida de un sujeto. Los métodos y kits encontrarán una amplia aplicación en el análisis de muestras de sangre completa que tienen un intervalo de diferentes volúmenes que incluyen aquellos de lactantes y niños u otros sujetos en los que el volumen de muestra es limitante o en los que son deseables pequeños volúmenes de muestra.

15 **Antecedentes**

Los detalles bibliográficos de las publicaciones citadas por el autor en esta memoria descriptiva se recogen al final de la descripción.

20 La referencia en esta memoria descriptiva a cualquier publicación anterior (o información derivada de ella), o a cualquier materia que es conocida, no es y no debe tomarse como reconocimiento o admisión o cualquier forma de sugerencia de que la publicación anterior (o información derivada de ella) o materia conocida forme parte del conocimiento general común en el campo de actuación al que se refiere esta memoria descriptiva.

25 La función de la respuesta inmunitaria es desarmar patógenos invasores o toxinas. La respuesta inmunitaria puede en algunas circunstancias ser muy destructora para un organismo y la supervivencia depende de la capacidad del sistema inmunitario para distinguir la propia de la no propia. Las enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, se desarrollan cuando el sistema inmunitario responde en exceso a sí mismo. Algunas respuestas inmunitarias son contra moléculas no propias que son relativamente inocuas. El asma y la fiebre del heno, por ejemplo, implican respuestas inmunitarias no a sí mismo en las que la respuesta inmunitaria es más debilitante que el agente causante. Generalmente, el sistema inmunitario innato descarta respuestas a organismos no patógenos y ayuda a prevenir respuestas inmunitarias adaptativas a tales agentes inocuos.

35 Las respuestas inmunitarias adaptativas se llevan a cabo por linfocitos tales como linfocitos B que llevan a cabo respuestas de anticuerpos o linfocitos T que llevan a cabo respuestas celulares. Los linfocitos B producen inmunoglobulinas que ayudan a desactivar patógenos y toxinas. Los linfocitos T reaccionan directamente con moléculas no propias (antígenos) que se presentan sobre la superficie de células huésped en asociación con moléculas de histocompatibilidad mayor (MHC) que proporcionan un repertorio de moléculas "propias". En ambos casos se genera una respuesta celular que es específica para epítopes particulares de la molécula no propia y proporciona una red de respuestas inmunitarias y moléculas efectoras inmunitarias.

45 Por consiguiente, un método de diagnóstico o monitorización de una infección o evaluación de la capacidad de un sujeto para crear una respuesta inmunitaria contra no uno mismo, es determinar si el sujeto ha creado una respuesta inmunitaria contra la estimulación del antígeno. Como la respuesta de los linfocitos T comprende la producción de linfocitos T efectoras que son capaces de responder contra un antígeno o pueden estimularse para responder al antígeno produciendo moléculas efectoras inmunitarias, puede medirse la producción de estas moléculas *in vitro* en respuesta a antígenos específicos como una medida de una respuesta inmunitaria mediada por células. Sin embargo, como las moléculas antigénicas no propias se presentan a linfocitos T por células presentadoras de antígeno, hay una compleja interacción de moléculas y células que debe tener lugar satisfactoriamente *in vitro* con el fin de producir suficientes moléculas efectoras inmunitarias para la detección.

55 La mayoría de los métodos *in vitro* para detectar respuestas inmunitarias celulares implican la purificación de células mononucleares de sangre periférica de sangre completa usando diversas técnicas de separación. Tales ensayos incluyen ensayos de liberación de cromo, ensayos de citotoxicidad, ensayos de tetrámeros de la clase I del MHC, ensayos para IFN- γ u otras citocinas, de los que ELISPOT proporciona un buen ejemplo. El método ELISPOT inmoviliza células presentadoras de antígeno y se ha usado para detectar el número de linfocitos T que producen ciertas citocinas en respuesta a estimulación antigénica.

60 Si se usa sangre completa, se diluye generalmente en un medio de cultivo con el fin de diluir los glóbulos rojos, que se considera que reduce la sensibilidad de los ensayos. Un ensayo de respuesta inmunitaria mediada por células en tubo que usa sangre completa sin diluir se describe en la publicación internacional N^o WO 2004/042396 a nombre de Cellestis Limited. La publicación internacional N^o WO 2004/042396 desvela el uso de tubos de extracción de sangre para la incubación de muestra con antígeno y un azúcar simple y muestra sensibilidad potenciada usando el sistema de tubos en comparación con ensayos en los que la sangre se transfiere a y se incuba en placas de microtitulación de pocillos.

65

Para los ensayos de sangre completa en seres humanos y animales de ganado, se toman al menos aproximadamente tres mililitros de sangre del sujeto con el fin de proporcionar material suficiente para realizar los ensayos de respuesta inmunitaria mediada por células. Esta cantidad se toma generalmente por muestreo de sangre venosa, mediante aguja en un recipiente de recogida, frecuentemente a vacío.

5 Diversos métodos de detección de moléculas efectoras inmunitarias, tales como enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), o métodos citométricos, pueden usar volúmenes pequeños, sin embargo, hay una necesidad en la materia de sistemas mejorados para la realizar las fases de estimulación antigénica de ensayos de respuesta inmunitaria mediada por células *in vitro*. En particular, se necesitan métodos que permitan la prueba de sangre completa en pequeños volúmenes de sangre tales como aquellos obtenidos por muestreo capilar periférico. La capacidad para cribar pequeñas muestras de sangre facilitaría enormemente el muestreo de niños u otros sujetos en los que la sangre puede estar limitada o ser difícil de obtener, y permite el muestreo de sangre sin muestreo de sangre venosa usando sangre capilar tal como la obtenida por la prueba de punción del pulgar, talón, lóbulo de la oreja u otro sitio conveniente, y probar múltiples o un intervalo de antígenos que incluyen estimulantes de mitógeno y de haptenos en una única extracción de sangre de bajo volumen.

Resumen de la invención

20 La invención proporciona un método de medición de una respuesta inmunitaria mediada por células (CMI) en una muestra de sangre completa recogida de un sujeto en el que dicha muestra de sangre completa comprende células del sistema inmunitario que son capaces de producir moléculas efectoras inmunitarias tras la estimulación por un antígeno, comprendiendo el método: a) incubar una muestra de sangre completa de un capilar periférico o de una arteria o vena de un sujeto con un antígeno en un recipiente de incubación sin dilución de la muestra en el que la forma de la muestra en el recipiente tiene una o dos dimensiones seleccionadas de: (i) un diámetro circular máximo inferior a 6 mm; y (ii) una altura de al menos 4 mm a 6 mm a una altura máxima de 12 mm a 20 mm; en el que el volumen de muestra total incubado es inferior a 500 μ l; y b) detectar o medir la presencia o elevación en el nivel de una molécula efectora inmunitaria o de una molécula de ácido nucleico capaz de producir una molécula efectora indicativa de la capacidad del sujeto para crear una respuesta inmunitaria mediada por células.

30 La invención también proporciona un kit para medir una respuesta inmunitaria mediada por células (CMI) en una muestra de sangre completa recogida de un sujeto, en el que dicha muestra de sangre completa comprende células del sistema inmunitario que producen moléculas efectoras inmunitarias tras la estimulación por un antígeno, comprendiendo el kit: (a) uno o más recipientes de incubación adecuados para contener o incubar una muestra de sangre completa de capilares periféricos o sangre venosa o arterial completa en el que la forma de la muestra en el recipiente tiene una o dos dimensiones seleccionadas de: (i) un diámetro circular máximo inferior a 6 mm; y (ii) una altura de al menos 4 mm a 6 mm a una altura máxima de 12 mm a 20 mm; en el que el volumen de muestra total incubado es inferior a 500 μ l; (b) uno o más antígenos de prueba para el análisis de respuestas CMI *in vitro* a los mismos y opcionalmente un antígeno de control; y (c) reactivos para medir la presencia o elevación en el nivel de una molécula efectora inmunitaria, en el que los reactivos comprenden un conjugado de anticuerpo para detectar interferón- γ (IFN- γ).

Resumen de la divulgación

45 La presente invención se declara, en parte, tras el sorprendente descubrimiento de que es posible generar y detectar una respuesta inmunitaria mediada por células en un volumen de sangre completa muy pequeño de un sujeto, y que ésta no tiene que ser sangre venosa o arterial. Esto significa que la recogida de sangre para la realización de ensayos de respuesta inmunitaria mediada por células puede lograrse usando, por ejemplo, muestreo por punción de sangre de capilares periféricos que generalmente da volúmenes de aproximadamente un mililitro o menos. Además, que muestras de sangre completa muy pequeñas pueden probarse para su capacidad para producir moléculas efectoras inmunitarias, facilitando múltiples pruebas de muestras pequeñas.

55 En una amplia realización, la presente invención proporciona un método de medición de una respuesta inmunitaria mediada por células en una muestra de un sujeto, en el que la muestra comprende células que secretan una molécula efectora inmunitaria tras la estimulación por un agente tal como un antígeno. En una realización particular, la presente invención proporciona un método de medición de una respuesta inmunitaria mediada por células (CMI) en una muestra de sangre completa recogida de un sujeto, en el que dicha muestra de sangre completa comprende células del sistema inmunitario que son capaces de producir moléculas efectoras inmunitarias tras la estimulación por un antígeno, comprendiendo el método: (i) incubar una muestra de sangre completa de un capilar periférico o inferior a 0,5 ml de sangre completa de una arteria o vena de un sujeto con un antígeno en un recipiente de incubación sustancialmente sin dilución de la muestra; y (ii) detectar o medir la presencia de una molécula efectora inmunitaria o de una molécula de ácido nucleico capaz de producir una molécula efectora indicativa de la capacidad del sujeto para crear una respuesta celular.

65 En otra realización, el método comprende: (i) recoger una muestra de sangre completa de un capilar periférico o inferior a 0,5 ml de sangre completa de una arteria o vena de un sujeto en un recipiente; (ii) incubar la sangre completa con un antígeno y anticoagulante; y (iii) detectar o medir la presencia de una molécula efectora inmunitaria

o de una molécula de ácido nucleico capaz de producir una molécula efectora inmunitaria indicativa de la capacidad del sujeto para crear una respuesta celular.

5 El método encontrará una amplia aplicación en la selección de un protocolo terapéutico adecuado para el tratamiento de un sujeto que tiene, por ejemplo, una patología inflamatoria, una infección por patógenos tal como una producida por un patógeno bacteriano, viral, parasítico o fúngico, un trastorno autoinmunitario, inmunoincompetencia, alergia o cáncer o una propensión a desarrollar dicho trastorno.

10 En una realización preferida, los métodos comprenden recoger y/o incubar una muestra de sangre capilar o recoger una muestra del sujeto con un dispositivo de muestreo capilar.

15 El método comprende, en algunas realizaciones, incubar la muestra con un agente en condiciones en las que la forma de la muestra comprenda una dimensión que se ha optimizado. En algunas realizaciones, la dimensión se ha optimizado para un sujeto particular o población de sujetos. En otras realizaciones, la dimensión se ha optimizado para una muestra celular particular. En algunas realizaciones, la dimensión es la altura de la muestra. En otra realización, el volumen se optimiza. En otra realización, la concentración de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) u otras células inmunitarias también se optimiza. Por "optimizado" se indica que el valor de dimensión seleccionado o intervalo proporciona la respuesta celular óptima en comparación con otros valores o intervalos probados. Así, en algunas realizaciones, la muestra comprende una dimensión que se ha preseleccionado usando los métodos desvelados en el presente documento para proporcionar una respuesta celular óptima.

25 Como se ilustra en el Ejemplo 1, las pruebas de inmunoensayo asociado a conjugado estándar demostraron que IFN- γ se produce en volúmenes totales de incubación de sangre tan pequeños como 0,5 ml, 0,4 ml, 0,3 ml, 0,2 ml y 0,1 ml. Otros experimentos, descritos en los Ejemplos 2 a 4, muestran que la incubación de muestras de sangre tan pequeñas como 20 μ l y/o que tienen una altura de muestra de 4 mm pueden generar moléculas efectoras inmunitarias suficientes para ser útiles en un ensayo de diagnóstico. Se obtienen resultados óptimos en alturas de muestra de aproximadamente 6 mm a aproximadamente 12 mm o aproximadamente 5 mm a aproximadamente 18 mm y valores intermedios, independientemente del volumen de muestra recogido o incubado.

30 El recipiente de incubación de la invención es adecuado para mantener una forma óptima de la muestra, en el que la forma tiene una o dos dimensiones seleccionadas de: (i) un diámetro circular máximo inferior a aproximadamente 6 mm; y (ii) una altura de al menos aproximadamente 4 mm a 6 mm a una altura máxima de aproximadamente 12 mm a 20 mm; en el que el volumen de muestra total incubado es inferior a 0,5 ml y opcionalmente inferior a aproximadamente 400 μ l.

35 En el presente documento se desvela un kit para medir una respuesta celular a un agente en una muestra de sangre completa de un sujeto, comprendiendo el kit: un recipiente de recogida alojado por separado o junto con un agente capaz de estimular una célula inmunitaria para secretar una molécula efectora inmunitaria, y que adicionalmente comprende opcionalmente instrucciones para su uso. En algunas realizaciones, la muestra se transfiere de un recipiente de recogida a uno o más recipientes para la incubación con antígeno y el kit comprende uno o más recipientes de recogida y uno o más recipientes de incubación. Convenientemente, en algunas realizaciones, el recipiente de recogida comprende anticoagulante. En otras realizaciones, el recipiente de incubación comprende antígeno y opcionalmente un azúcar simple tal como dextrosa.

45 En el presente documento se desvelan kits para medir una respuesta inmunitaria mediada por células en una muestra de sangre completa recogida de un sujeto, comprendiendo los kits en forma multicomponente: (i) uno o más recipientes de recogida y/o de incubación adecuados para contener o incubar una muestra de sangre de capilares periféricos o inferior a 0,5 ml de sangre venosa o arterial completa; (ii) uno o más antígenos de prueba para el análisis de respuestas *in vitro* a los mismos y opcionalmente un antígeno de control; (iii) reactivos para medir la presencia o elevación en el nivel de una molécula efectora inmunitaria; y (iv) opcionalmente un conjunto de instrucciones que comprenden cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento. En algunas realizaciones, el recipiente de incubación es adecuado para mantener una forma óptima de la muestra, en el que la forma tiene una o dos o más dimensiones seleccionadas de: (i) un diámetro circular máximo inferior a aproximadamente 6 mm; (ii) una altura de al menos aproximadamente 4 mm a 6 mm a una altura máxima de aproximadamente 12 mm a 20 mm; o (iii) un volumen inferior a 0,5 ml y opcionalmente inferior a 400 μ l.

60 Las instrucciones, por ejemplo, pueden comprender instrucciones para recoger sangre completa y mezclar sangre en recipientes de recogida/incubación con el fin de mezclar anticoagulante con la sangre. En otras realizaciones, las instrucciones incluyen instrucciones para incubar la muestra de sangre completa con un antígeno y opcionalmente con un antígeno de control o mitógeno. En otras realizaciones, las instrucciones comprenden instrucciones para centrifugar el recipiente de incubación y recoger plasma. En algunas realizaciones, las instrucciones comprenden instrucciones para detectar una molécula efectora inmunitaria en plasma.

65 En algunas realizaciones, el recipiente de recogida está marcado para identificar una altura de muestra de aproximadamente 12 mm. En algunas realizaciones, el kit comprende una pluralidad de recipientes de recogida marcados de las mismas dimensiones y/o diferentes. En algunas realizaciones, el kit comprende un dispositivo de

- muestreo capilar. En otra realización, el kit comprende uno o más antígenos de prueba para el diagnóstico y opcionalmente un mitógeno como antígeno de control para el análisis de respuestas *in vitro* al mismo. Opcionalmente, el kit comprende además reactivos apropiados para medir la presencia o elevación en el nivel de una molécula efectora inmunitaria o sus moléculas codificantes, que incluyen controles positivos y negativos.
- 5 En algunas realizaciones, el kit comprende además reactivos apropiados para la realización de un ensayo para la detección de efectores inmunitarios. En una realización, el ensayo es un ensayo para IFN- γ , o una molécula efectora aguas abajo. En una realización preferida, el reactivo comprende un conjugado de anticuerpo para detectar IFN- γ , TNF o GM-CSF. En una realización a modo de ejemplo, el conjugado de anticuerpo detecta IFN- γ . Tales ensayos incluyen, por ejemplo, un ensayo basado en ELISA o ELISPOT o ensayos similares conocidos en la técnica. En otra
- 10 realización, el ensayo es un ensayo de transcripción inversa-amplificación para ARN que codifica la molécula efectora inmunitaria, tal como IFN- γ . Tales ensayos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª Edición, CSHLP, CSH, NY, 2001 y Ausubel (Ed) *Current Protocols in Molecular Biology*, 5ª Edición, John Wiley & Sons, Inc, NY, 2002.
- 15 En otro aspecto, la presente invención contempla métodos que pueden automatizarse o semi-automatizarse, programas informáticos, productos informáticos, ordenadores para facilitar la interpretación de la salida de los ensayos objeto.

El resumen anterior no es y no debe considerarse una recitación exhaustiva de todas las realizaciones de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

25 La **Figura 1** es una representación en diagrama de un sistema usado para llevar a cabo las instrucciones codificadas por el medio de almacenamiento. (Referencia)

La **Figura 2** es una representación en diagrama de una sección transversal de un medio de almacenamiento magnético. (Referencia)

30 La **Figura 3** es una representación en diagrama de una sección transversal de un sistema de almacenamiento de datos ópticamente legibles 10. (Referencia)

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

35 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por aquellos expertos habituales en la materia a la que la invención pertenece. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, se describen métodos y materiales preferidos. Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

40 El término "aproximadamente" proporciona alguna variación o corrección en el valor numérico del término al que precede. Se refiere a una cantidad, volumen, nivel, valor, porcentaje, dimensión, tamaño o cantidad que varía nada menos que el 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 % o 3 % con respecto a un término citado. Así, "al menos aproximadamente 6 mm" incluye 4 mm o 5 mm además de 6 mm y alturas superiores a 6 mm, mientras que

45 "aproximadamente 12 mm" incluye 13 mm, 14 mm, 15 mm o 16 mm y alturas más pequeñas de 12 mm. Además, el término cubre partes de valores numéricos unitarios, tales como 6,5 mm o 6,9 mm etc. En una realización preferida, la variación es menor y está limitada a una variación del 10 % o 15 % en el valor numérico.

50 Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del sujeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un antígeno" significa un antígeno o más de un antígeno, "una molécula efectora inmunitaria" significa una o más moléculas efectoras inmunitarias.

55 El término "antígeno", como se usa en el presente documento, incluye cualquier molécula o agente que estimule una respuesta inmunitaria, y particularmente una respuesta inmunitaria mediada por células, e incluye una proteína o péptido antisentido, un hapteno, mitógeno, alérgeno o toxina o cualquier molécula que existe de forma natural o sintética o partes de las mismas que tienen esta actividad. En algunas realizaciones, el antígeno comprende uno o más polipéptidos de longitud completa o de longitud parcial. En otras realizaciones, el antígeno comprende un péptido o un conjunto de péptidos de uno o más polipéptidos de longitud completa o longitud parcial diferentes. En algunas realizaciones, se emplean antígenos que imitan uno o más de los efectos de antígenos presentados al sistema inmunitario *in vivo*. Generalmente, los antígenos de prueba están seleccionados para la selectividad y sensibilidad óptimas en una población o sujeto dado. En una realización ilustrativa, el antígeno es un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno específico de tuberculosis (TB). En otras realizaciones, el antígeno es un derivado de proteína purificada de *Mycobacterium tuberculosis* o *M. avium*. En algunas realizaciones, el antígeno simula proteínas micobacterianas tales como ESAT-6 (Skjot et al., *Infection and Immunity*, 68(1):214-20, 2000), CFP-10 y TB7 (Brock et al., *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, 5(5):462-467, 2001). Puede usarse un mitógeno como control positivo o para detectar la capacidad de células en la muestra para crear una

65

respuesta inmunitaria no específica de antígeno. En otras realizaciones, el agente es un mitógeno. En otras realizaciones, el antígeno está seleccionado de un auto-antígeno, un antígeno de un organismo patógeno, un metal o molécula inorgánica que estimula la respuesta inmunitaria, o un antígeno de tumor. En algunas realizaciones, el agente (antígeno) es un fosfolípido, fosfoproteína o fosfolipoproteína. En otra realización ilustrativa, el antígeno es de citomegalovirus (CMV). En algunas realizaciones, el antígeno de un organismo patógeno es un antígeno bacteriano, viral, parasítico o fúngico o análogo de los mismos.

A menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que la palabra “comprenden”, y variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, implica la inclusión de un número entero establecido o etapa o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Cada realización descrita en el presente documento debe aplicarse, cambiando lo que se deba cambiar, a todas y cada una de otras realizaciones, a menos que se establezca específicamente de otro modo.

Preferentemente, el “sujeto” es humano. La presente invención contempla, sin embargo, primates, animales de ganado, animales de compañía y especies aviares, además de animales no mamíferos tales como reptiles y anfibios. El ensayo tiene aplicaciones, por tanto, en terapia, diagnóstico y monitorización humana, de ganado, veterinaria y de la vida salvaje. En algunas realizaciones, el sujeto humano está seleccionado de un grupo que presenta un atributo o condición particular. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto pediátrico, adulto o geriátrico. En algunas realizaciones, el sujeto tiene o ha tenido una infección por patógenos, un trastorno autoinmunitario, o cáncer, o está recibiendo tratamiento para el cáncer, o tiene una propensión a desarrollar una afección tal, está inmunodeprimido o está experimentando una respuesta inflamatoria. Una vez el sujeto ha sido evaluado, que incluye usando los presentes métodos y/o kits, puede entonces tratarse, y, por consiguiente, también se contemplan específicamente métodos que engloban diagnóstico y tratamiento.

Por consiguiente, la presente invención proporciona cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento en los que el sujeto es humano, que incluye un sujeto pediátrico, adulto o geriátrico. En otras realizaciones, el sujeto es un animal o ave, tal como ganado, animal de carreras; exótico, migratorio o ave.

Como se ha establecido anteriormente, una de las ventajas significativas de la presente invención es la facilidad para realizar ensayos de CMI usando sangre completa sin diluir de un capilar periférico. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el método comprende recoger una muestra del sujeto con un dispositivo de muestreo capilar. El dispositivo puede ser un dispositivo de punción adecuado para el muestreo de capilares de cualquier capilar periférico tal como aquellos del pulgar, dedo, talón, dedo del pie, lóbulo de la oreja, etc. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende un tubo capilar. Un tubo capilar u otro recipiente estrecho o cónico es útil para formar una forma de muestra de altura óptima con muestras inferiores a 500 μ l, tal como aquellos de entre aproximadamente 20 μ l y 50 μ l y aproximadamente 200 μ l y 250 μ l. Según la invención, el recipiente de incubación es adecuado para mantener una forma óptima de la muestra, en el que la forma tiene una o dos dimensiones seleccionadas de: (i) un diámetro circular inferior a 6 mm; y (ii) una altura de al menos aproximadamente 4 mm a 6 mm a una altura máxima de aproximadamente 12 mm a 20 mm, en el que el volumen de muestra total incubado es inferior a 0,5 ml. En algunas realizaciones, la muestra en el recipiente tiene una altura de al menos aproximadamente 6 mm a un máximo de aproximadamente 12 mm. En algunas realizaciones, la muestra tiene una altura de 4 mm, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm, 11 mm, 12 mm, 13 mm, 14 mm, 15 mm, 16 mm, 17 mm, 18 mm, 19 mm o 20 mm o una altura intermedia. En otras realizaciones, la muestra tiene una altura de 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm, 11 mm o 12 mm o una altura intermedia. Con respecto al volumen de la muestra, en algunas realizaciones, el volumen de muestra total incubado es inferior a 400 μ l, inferior a 300 μ l, inferior a 200 μ l, inferior a 100 μ l, o inferior a 50 μ l. Si la muestra es sangre capilar, el volumen de muestra total incubado puede ser de aproximadamente 400 μ l, 300 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 50 μ l o 40 μ l o un volumen intermedio. En algunas realizaciones, la muestra se recoge en un tubo capilar de aproximadamente 3-4 mm de diámetro.

Referencia a “células inmunitarias” incluye células tales como linfocitos que incluyen linfocitos citolíticos espontáneos (NK), linfocitos T (linfocitos CD4⁺ y/o CD8⁺), linfocitos B, macrófagos y monocitos, células dendríticas o cualquier otra célula que sea capaz de producir una molécula efectora en respuesta a estimulación de antígenos directa o indirecta. Convenientemente, las células inmunitarias son linfocitos y más particularmente linfocitos T.

Por consiguiente, la presente invención contempla métodos como se han desvelado en el presente documento en los que las células inmunitarias están seleccionadas de un linfocito citolítico espontáneo (NK), linfocito T, linfocito B, macrófago o monocito. En una realización preferida, las células son linfocitos T.

Las moléculas efectoras inmunitarias pueden ser cualquiera de varias moléculas que se producen en respuesta a activación celular o estimulación por un antígeno. Aunque un interferón (IFN) tal como IFN- γ es una molécula efectora inmunitaria particularmente útil, otras incluyen una gama de citocinas tales como interleucinas (IL), por ejemplo IL-2, IL-3 IL-4, IL-5, IL-10 o IL-12, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , TNF- β), un factor estimulante de colonias (CSF) tal como granulocitos (G)-CSF o granulocitos-macrófagos (GM)-CSF, entre muchos otros, tales como el complemento o componentes en la vía del complemento, perforinas, defensinas, catelicidinas, granzimas, ligando

Fas, ligando CD-40, exotoxinas, citotoxinas, quimiocinas y monocinas.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos en los que la molécula efectora inmunitaria es una citocina, componente del sistema del complemento, perforina, defensina, catelicidina, granzima, ligando Fas, ligando CD-40, exotoxina, citotoxina, quimiocina o monocina. En una realización preferida, la citocina es IFN- γ , TNF α o GM-CSF.

Por "sangre completa" se indica sangre de un sujeto que no ha sido sustancialmente diluida o fraccionada, manteniendo el entorno ambiental de la sangre para las células tan próximo a las condiciones de plasma natural como sea práctico. Así, la adición de pequeños volúmenes o cantidades secas de, por ejemplo, antígeno, azúcar o anticoagulante no constituye dilución según la presente invención, mientras que la adición de medio de cultivo en exceso del volumen de sangre constituye dilución. También se desvelan en el presente documento muestras que contienen células inmunitarias tales como líquido linfático, líquido cerebral, líquido de tejido (tal como médula ósea o líquido del timo) y líquido respiratorio que incluye líquido nasal y pulmonar. También pueden obtenerse derivados de estas muestras por procesamiento. Por ejemplo, se obtienen células de la capa leucocitaria o células mononucleares de sangre periférica o células del procesamiento de antígenos por métodos conocidos en la técnica. También puede tratarse sangre completa para eliminar componentes tales como glóbulos rojos y/o plaquetas por métodos conocidos en la técnica. Se produciría dilución sustancial mediante la adición a la muestra de más de aproximadamente el 40 % al 50 % del volumen original.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, el método comprende detectar la presencia de una molécula efectora o una molécula de ácido nucleico capaz de producir una molécula efectora. En esta realización, la presencia o una elevación en el nivel de una molécula efectora o una molécula de ácido nucleico capaz de producir la molécula efectora es indicativa de la capacidad del sujeto para crear una respuesta celular.

En una realización ilustrativa, la forma de la muestra comprende una altura que ha sido optimizada. En un ejemplo de esta realización, la muestra celular comprende una altura de al menos 6 milímetros (mm) a un máximo de aproximadamente 12 mm o cualquier altura intermedia. Como apreciará el experto, el requisito presentemente desvelado para una altura optimizada para la muestra permite variación o elección considerable referente al volumen de muestra empleado, a condición de que sea inferior a 500 μ l, y la forma del recipiente en el que la muestra se incuba. Podría incubarse una muestra de 50 microlitros (μ l), por ejemplo, en un tubo capilar de 3-4 mm de diámetro con el fin de proporcionar una altura de muestra de al menos aproximadamente 6 mm a un máximo de aproximadamente 12 mm o cualquier altura intermedia. La presente invención no está necesariamente limitada a ningún volumen de muestra particular que va a incubarse, a condición de que sea inferior a 500 μ l, o a cualquier dimensión o forma particular del recipiente que contiene la muestra. La presente invención facilita el uso de menos de 500 μ l de sangre (incluyendo volúmenes de muestreo capilar) y, por tanto, evita la necesidad de muestreo de sangre venosa. Además, que no hay necesidad de diluir la sangre, que requiere etapas de manipulación adicionales y mantiene la sangre en su estado opcional para medir una respuesta inmunitaria. Las alturas óptimas anteriores han sido determinadas usando sangre completa de donantes humanos. Otros sujetos o poblaciones de sujetos o subgrupos o tipos de muestra celular tienen diferentes características y presentan alguna variación en la altura óptima para la incubación de muestras. En estos grupos se contempla alguna variación menor adicional en la altura mínima y máxima para la incubación de muestras mediante optimización. Una vez se ha apreciado la presente invención, tal optimización está perfectamente dentro de la experiencia del destinatario.

En algunas realizaciones, el recipiente en el que la muestra y el antígeno se co-incuban también es el recipiente de recogida usado para recoger la muestra del sujeto. Puede usarse uno cualquiera de un gran número de diferentes recipientes disponibles a condición de que proporcionen dimensiones de muestra adecuados. Varios tubos diferentes se describen en los ejemplos con el fin de ilustración y la presente invención no está limitada de ninguna forma a estos recipientes. En algunas realizaciones, el recipiente es un tubo que comprende un vacío para facilitar la recogida de sangre de un sujeto. En otras realizaciones, el recipiente es un tubo capilar. En algunas realizaciones, se usa un tubo capilar para recoger sangre de la superficie de la piel por acción capilar. En algunas realizaciones, la muestra se recoge de un sujeto en un recipiente de recogida que contiene antígeno o al que posteriormente se le añade antígeno. En algunas realizaciones, la sangre se muestrea usando un dispositivo de muestreo capilar tal como un dispositivo de punción con aguja y la sangre se recoge en un recipiente de recogida heparinizado y posteriormente se transfiere a un recipiente apropiado para la co-incubación con agente.

En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre. Generalmente, la sangre se mantiene en presencia de un anticoagulante, tal como heparina que puede estar en el recipiente cuando la sangre se añade o se añade posteriormente. Opcionalmente, un azúcar simple tal como dextrosa está contenido en el recipiente o se añade a la mezcla de incubación. En algunas realizaciones preferidas, la muestra de sangre es una muestra de sangre completa. En algunas realizaciones, la sangre completa de un sujeto se recoge en un recipiente que contiene antígeno y/o anticoagulante, en otras realizaciones, el antígeno y/o anticoagulante se añaden a la sangre a partir de aquí.

En una realización, el método comprende: recoger una muestra de sangre de un sujeto usando un dispositivo de muestreo capilar e introducir la sangre en un recipiente de recogida adecuado. En algunas realizaciones, el dispositivo de muestreo capilar comprende un anticoagulante y el antígeno. En otras realizaciones, el recipiente de

- recogida o recipiente posterior comprende el antígeno. En otras realizaciones, el recipiente de recogida comprende un azúcar simple tal como dextrosa u otro agente que mantiene la capacidad de las células de muestra para crear una respuesta CMI. Sea cual sea la vía, el método comprende poner en contacto el antígeno con la muestra de sangre sustancialmente sin dilución de la muestra e incubar la muestra con el antígeno en condiciones en las que la
- 5 forma de la muestra comprende una altura que ha sido optimizada para un sujeto particular o población de sujetos o tipo de muestra. En otra realización, el método comprende incubar la muestra con el agente y detectar la presencia de una molécula efectora o una molécula de ácido nucleico capaz de producir una molécula efectora. En una realización ilustrativa, la molécula efectora inmunitaria es una citocina tal como IFN- γ .
- 10 En otras realizaciones, la sangre se recoge mediante procedimientos convencionales en un recipiente de recogida y se transfiere a los recipientes (de prueba) de muestra de dimensiones pre-determinadas para garantizar que un volumen de sangre definido se incubaba con el antígeno en condiciones en las que la forma de la muestra comprende una altura o volumen que ha sido optimizado para un sujeto particular o población de sujetos o tipo de muestra.
- 15 El uso de tubos de extracción de sangre como recipientes de recogida y recipientes de prueba se desvela en la publicación internacional N^o WO 2004/042396 a nombre de Cellestis Limited.
- En algunas realizaciones, el dispositivo de muestreo capilar es un dispositivo de punción, tal como, pero ni mucho menos limitado a, aquellos descritos en la patente de EE.UU. N^o 4.469.110.
- 20 En otra realización, el método comprende evaluar una respuesta inmunitaria mediada por células en una muestra de sangre de uno o más grupos de sujetos, en los que las muestras de cada grupo de sujetos se evalúan para determinar un volumen mínimo de muestra que va a evaluarse de cada grupo de sujetos. Opcionalmente, el método comprende muestrear la cantidad de sangre apropiada para cada sujeto o grupo de sujetos, en el que cada muestra
- 25 comprende, durante la incubación con antígenos, una forma que comprende una altura que ha sido optimizada para un sujeto particular o población de sujetos o tipo de muestra. De esta forma, por ejemplo, el resultado del análisis de las muestras del sujeto que comprenden pequeños volúmenes de muestra (inferiores a 500 μ l) puede compararse fácilmente con los resultados de muestras mayores que comprenden, por ejemplo, varios mililitros de sangre. Así, la presente invención, caracterizando y controlando una variable en el ensayo de respuesta celular, potencia el valor
- 30 de diagnóstico de la salida del ensayo.
- La presente invención también declara, en parte, que la observación de la altura de la muestra durante la incubación, determinada por la forma del recipiente de incubación, puede usarse para modular la sensibilidad de los ensayos de respuesta inmunitaria mediada por células. En una realización, la presente invención proporciona un
- 35 método de medición de una respuesta inmunitaria mediada por células en una muestra celular, comprendiendo dicho método: incubar la muestra con un antígeno en condiciones en las que la forma de la muestra comprende una altura de al menos 6 milímetros (mm) a aproximadamente 12 mm. En una aplicación particularmente útil de esta observación, la presente invención proporciona un método de ensayo de muestras de menos de 500 μ l de sujetos en los que el volumen de muestra es limitante o en los que son deseables bajos volúmenes de muestra. Según una
- 40 realización de la presente invención puesta en práctica con las muestras de sangre, se emplean muestras de sangre tan pequeñas como aproximadamente 20 μ l a aproximadamente 200 μ l, en las que la forma de la muestra durante la incubación comprende una altura de al menos aproximadamente 6 milímetros (mm) en su punto más alto a una altura máxima de aproximadamente 12 mm en su punto más alto.
- 45 En el presente documento también se desvela un método de realización de un ensayo de respuesta inmunitaria mediada por células en una muestra de un sujeto, en el que dicho método evita el uso de agujas, comprendiendo el método recoger sangre usando un dispositivo de muestreo capilar para tomar pequeños volúmenes de sangre. En otro aspecto relacionado, la invención engloba la práctica de los ensayos descritos en el presente documento que incluyen el uso de pequeños volúmenes de muestra tales como una o más muestras de aproximadamente 20 μ l a
- 50 menos de, pero aproximadamente, 1 ml. En otras realizaciones se emplea el muestreo de sangre estándar para las técnicas de ensayo celular y se usan mayores volúmenes de muestra, normalmente 1 ml a 5 ml, pero que engloban volúmenes tan grandes como aproximadamente 10 a 200 ml o más. En una realización preferida, el volumen total de incubación de sangre completa está dentro del intervalo de aproximadamente 50 μ l a menos de aproximadamente 500 μ l.
- 55 La presente invención proporciona un método de medición de una respuesta inmunitaria mediada por células (CMI) en una muestra de sujeto que comprende incubar la muestra con un agente en condiciones en las que la forma de la muestra comprende una dimensión que ha sido optimizada. En algunas realizaciones, la muestra celular se incubaba con el antígeno durante de aproximadamente 4 o 5 a aproximadamente 50 horas.
- 60 En algunas realizaciones, el método se basa en medir la producción de moléculas efectoras inmunitarias por células del sistema inmunitario en respuesta a estimulación antigénica. En otras realizaciones, la molécula efectora inmunitaria es la molécula efectora inmediata producida por linfocitos T efectoras en respuesta a la estimulación del antígeno. En otras realizaciones se mide un efector aguas abajo. Por ejemplo, IFN- γ u otras moléculas efectoras
- 65 inmediatas provocan la producción de moléculas efectoras adicionales cuya producción se mide. En otra realización, la producción de efectoras inmunitarias se mide midiendo el nivel o la presencia de moléculas de ácidos nucleicos

capaces de producir efectores inmunitarios. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los efectores inmunitarios pueden detectarse usando ligandos o moléculas de unión tales como anticuerpos específicos para los efectores o midiendo el nivel de expresión de genes que codifican los efectores. La presente invención proporciona, por tanto, un medio de determinación de la sensibilidad celular de un sujeto y, a su vez, proporciona un medio para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, afecciones patológicas, estado inmunitario, nivel de inmunocompetencia y un marcador de sensibilidad de linfocitos T a antígenos endógenos o exógenos.

Por consiguiente, en otra realización, la presente invención contempla un método de medición de una respuesta CMI en un sujeto, comprendiendo dicho método i) recoger una muestra de líquido del sujeto en un recipiente de recogida en el que dicha muestra comprende células del sistema inmunitario que producen moléculas efectoras inmunitarias tras la estimulación por un agente. En algunas realizaciones, el recipiente de recogida comprende un anticoagulante, tal como heparina. En otras realizaciones, el recipiente de recogida comprende el agente. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto el agente con la muestra en el recipiente de recogida. El método comprende además iii) incubar dicha muestra con un antígeno en condiciones en las que la forma de la muestra comprende una dimensión que ha sido optimizada. En algunas realizaciones, el método comprende opcionalmente iv) detectar la presencia de una molécula efectora inmunitaria o una molécula de ácido nucleico capaz de producir cualquiera de estas, en el que la presencia o elevación en el nivel de una molécula efectora o una molécula de ácido nucleico capaz de producir la molécula efectora es indicativa de la capacidad del sujeto para crear una respuesta celular. En otras realizaciones, el efector inmunitario es una citocina, citotoxina o quimiocina. En una realización ilustrativa, el efector inmunitario es IFN- γ .

En algunas realizaciones, la forma de la muestra se optimiza midiendo la función de células efectoras en muestras que tienen un intervalo de dimensiones y seleccionando la forma que está asociada a la medición más sensible de la función de células efectoras. En una realización preferida, se modifica la altura de la muestra. En una realización ilustrativa, la altura de la muestra se modifica a aproximadamente 12 mm para una altura máxima y aproximadamente 6 mm para una altura mínima.

Según una realización preferida, la presente invención proporciona un método de medición de una respuesta CMI en un sujeto humano, comprendiendo dicho método recoger una muestra de dicho sujeto humano usando un dispositivo de muestreo capilar en un recipiente de recogida. En algunas realizaciones, la muestra comprende células del sistema inmunitario que son capaces de producir moléculas efectoras inmunitarias tras la estimulación por un antígeno, mitógeno o hapteno. En algunas realizaciones, el método comprende incubar dicha muestra con un antígeno y entonces medir la presencia de o elevación en el nivel de una molécula efectora inmunitaria, en el que la presencia o nivel de dicha molécula efectora inmunitaria es indicativa de la capacidad de dicho sujeto humano para crear una respuesta inmunitaria mediada por células.

Por consiguiente, en otra realización preferida, la presente invención proporciona un método de medición de una respuesta CMI en un sujeto, comprendiendo dicho método recoger una muestra de dicho sujeto en un recipiente de recogida, en el que dicha muestra comprende células del sistema inmunitario que son capaces de producir moléculas de IFN- γ tras la estimulación por un antígeno, incubar dicha muestra con un antígeno y entonces medir la presencia de o elevación en el nivel de una molécula de IFN- γ , en el que la presencia o nivel de dicha molécula de IFN- γ es indicativa de la capacidad de dicho sujeto para crear una respuesta inmunitaria mediada por células.

La muestra recogida del sujeto se deposita generalmente en un recipiente de extracción de sangre. A pesar de que la sangre sin diluir completa es la muestra preferida y más conveniente, la presente invención se extiende a otras muestras que contienen células inmunitarias tales como líquido linfático, líquido cerebral, líquido de tejido y líquido respiratorio que incluye líquido nasal y pulmonar.

Las células del sistema de CMI pierden la capacidad de crear una respuesta CMI en sangre completa después de periodos prolongados tras la extracción de sangre del sujeto, y respuestas sin intervención están frecuentemente gravemente reducidas o ausentes 24 horas tras la extracción de sangre. La reducción de trabajo y la necesidad de equipo especializado en la presente invención permiten realizar la estimulación de CMI con antígenos en localizaciones de diagnóstico inmediato tales como consultorios médicos, clínicas, instalaciones ambulatorias y clínicas veterinarias o en granjas. Una vez se completa la estimulación del antígeno, ya no existe el requisito de células frescas y activas. IFN- γ y otras citocinas o moléculas efectoras inmunitarias son estables en plasma y, así, la muestra puede almacenarse, o transportarse sin condiciones especiales o requisitos de tiempo rápido de un modo similar a las muestras de suero estándar usadas para otra enfermedad infecciosa u otro diagnóstico de enfermedad.

La etapa de incubación puede ser de aproximadamente 4 o 5 horas a 50 horas, más preferentemente aproximadamente 5 horas a 40 horas, e incluso más preferentemente aproximadamente 8 a 24 o aproximadamente 16 a 24 horas, o un periodo de tiempo intermedio. En algunas realizaciones, después de una etapa de mezcla inicial opcional para distribuir los antígenos por toda la muestra, la incubación de muestra se lleva a cabo sin mezclar adicionalmente.

Por consiguiente, otra realización preferida de la presente invención contempla un método de medición de una

5 respuesta CMI en un sujeto que incluye un sujeto humano, comprendiendo dicho método recoger una muestra de sangre completa de dicho sujeto por muestreo capilar, incubar dicha muestra de sangre completa con un antígeno y a continuación medir la presencia o elevación en el nivel de una molécula efectora inmunitaria tal como IFN- γ , en el que la presencia o nivel de dicha molécula efectora inmunitaria es indicativa de la capacidad de dicho sujeto para crear una respuesta inmunitaria mediada por células.

10 La capacidad para medir la CMI es importante para evaluar la capacidad de un sujeto para responder a una infección por un agente patógeno, tal como un microorganismo o un virus o un parásito, para crear una respuesta autoinmunitaria tal como ocurre en la diabetes para proteger contra cánceres u otras afecciones oncológicas, o para probar la sensibilidad a antígenos medioambientales (prueba de alergia). Por consiguiente, la referencia a “medir una respuesta CMI en un sujeto” incluye y engloba diagnóstico inmunitario de enfermedades infecciosas y autoinmunitarias, un marcador para inmunocompetencia y la detección de respuestas de linfocitos T contra antígenos endógenos y/o exógenos (incluyendo una medida de la eficacia de una vacuna), además de un marcador para alergias, enfermedades inflamatorias y cáncer.

15 La capacidad para realizar esta prueba en pequeños volúmenes de sangre es importante para muestras pediátricas y otras muestras en las que la sangre puede ser limitante. La ausencia de cualquier etapa de manipulación en purificar linfocitos añade una ventaja en pequeños volúmenes de sangre, ya que la purificación y enumeración de linfocitos de pequeños volúmenes tiene dificultades prácticas, como la adición de medios estériles calientes y reactivos en un entorno estéril. La capacidad para obtener una respuesta CMI óptima en un pequeño volumen ajustando las proporciones relativas (tales como la forma, anchura y altura) del recipiente de incubación o muestra proporciona valiosas ventajas. Los términos vaso, recipiente, compartimento se usan indistintamente e incluyen cualquier receptáculo que contenga cualquier volumen, tal como un pocillo, inmersión, tubo, eppendorf y similares.

25 Enfermedades autoinmunitarias contempladas en el presente documento incluyen, entre otras, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípidos, esclerosis múltiple por enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide buloso, cardiomiopatía, celiacía-dermatitis, síndrome de fatiga crónica (CFIDS), inflamación crónica desmielinizante, polineuropatía por inflamación crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de las aglutininas frías, enfermedad de Crohn, dermatitis herpetiforme, lupus discoide, crioglobulinemia esencial mixta, fibromialgia, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, diabetes dependiente de insulina (tipo i), liquen plano, lupus, enfermedad de Meniere, enfermedad de tejido conjuntivo mixto, esclerosis múltiple, miastenia grave, miocarditis, 35 péñfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome de Stiff-Man, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal / arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis y vitiligo.

40 Es generalmente importante evaluar la posible sensibilidad de CMI o real en estos individuos.

Otras condiciones de enfermedad contempladas incluyen condiciones de enfermedad inflamatoria.

45 Ejemplos de condiciones de enfermedad inflamatoria contempladas por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquella enfermedad y trastornos que producen una respuesta de rojez, hinchazón, dolor, y una sensación de calor en ciertas áreas que pretenden proteger tejidos afectados por lesión o enfermedad. Enfermedades inflamatorias que pueden tratarse usando los métodos de la presente invención incluyen, sin estar limitadas a, acné, angina, artritis, neumonía por aspiración, enfermedad, empiema, gastroenteritis, inflamación, gripe intestinal, NEC, enterocolitis necrotizante, enfermedad inflamatoria pélvica, faringitis, PID, pleuritis, garganta seca, rojez, rubor, dolor de garganta, gripe estomacal e infecciones de las vías urinarias, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica,

55 La terapia para el cáncer también es algo dependiente de CMI. Cánceres contemplados en el presente documento incluyen: un grupo de enfermedades y trastornos que se caracterizan por crecimiento celular incontrolado (por ejemplo, formación de tumor) sin ninguna diferenciación de aquellas células en células especializadas y diferentes. Tales enfermedades y trastornos incluyen proto-oncogén ABL1, cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenoquístico, cáncer corticosuprarrenal, metaplasia mieloide agnógena, alopecia, sarcoma alveolar de partes blandas, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres de huesos, cáncer de intestino, glioma del tronco encefálico, tumores cerebrales y del SNC, cáncer de mama, tumores del SNC, tumores carcinoides, cáncer de cuello uterino, tumores cerebrales infantiles, cáncer infantil, leucemia infantil, sarcoma de tejido blando infantil, condrosarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cánceres colorrectales, linfoma cutáneo de linfocitos T, dermatofibrosarcoma protuberante, tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer endometrial,

ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de las vías biliares extrahepáticas, cáncer de ojo, ojo: melanoma, retinoblastoma, cáncer de las trompas de Falopio, anemia de Fanconi, fibrosarcoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor carcinoide gastrointestinal, cánceres genitourinarios, tumores de células germinativas, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, tumores malignos hematológicos, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, virus del papiloma humano, mola hidatídica, hipercalcemia, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, cáncer de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leiomiomas, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labio, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculina, tumor de riñón rabdoide maligno, meduloblastoma, melanoma, cáncer de células de Merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, mieloma, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de rotura de Nijmegen, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cánceres oculares, cáncer de esófago, cáncer de la cavidad bucal, cáncer bucofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario por oostomía, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer de la glándula parótida, cáncer de pene, tumores periféricos-neuroectodérmicos, cáncer de pituitaria, policitemia verdadera, cáncer de próstata, cánceres raros y trastornos asociados, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, síndrome de Rothmund-Thomson, cáncer de las glándulas salivales, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sézary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer del intestino delgado, sarcoma de tejido blando, tumores de la médula espinal, carcinoma de células escamosas (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de células transicionales (vejiga), cáncer de células transicionales (pelvis renal -/- uréter), cáncer trofoblástico, cáncer de uretra, cáncer del aparato urinario, uroplaquias, sarcoma uterino, cáncer de útero, cáncer vaginal, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, tumor de Wilms.

Puede probarse cualquiera de varios antígenos tales como aquellos específicos para un organismo, virus, autoantígeno o célula cancerosa particular. Alternativamente, pueden usarse agentes más generales para probar la capacidad genérica de una respuesta inmunitaria mediada por células. Ejemplos de los últimos incluyen PPD de *M. tuberculosis* y toxoide tetánico. Puede usarse cualquier péptido, polipéptido o proteína, hidrato de carbono, glicoproteína, fosfolípido, fosfoproteína o fosfolipoproteína o agente químico no de proteína en el presente sistema de ensayo.

Como se ha establecido anteriormente, la detección de las moléculas efectoras inmunitarias puede hacerse a niveles de proteína o de ácido nucleico. Por consiguiente, referencia a la "presencia o nivel de dicha molécula efectora inmunitaria" incluye datos directos e indirectos. Por ejemplo, altos niveles de ARNm de IFN- γ es datos indirectos que muestran elevados niveles de IFN- γ . Ensayos conocidos en la técnica para evaluar ARN se describen, por ejemplo, en Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª Edición, CSHLP, CSH, NY, 2001 y Ausubel (Ed) *Current Protocols in Molecular Biology*, 5ª Edición, John Wiley & Sons, Inc, NY, 2002.

Ligandos para los efectores inmunitarios son particularmente útiles en detectar y/o cuantificar estas moléculas. Anticuerpos para las moléculas efectoras inmunitarias son particularmente útiles. Técnicas para los ensayos contemplados en el presente documento se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayos de sándwich, ELISA y ELISPOT. También están incluidos dispositivos inmunocromatográficos de diagnóstico inmediato rápido. Referencia a "anticuerpos" incluye partes de anticuerpos, anticuerpos mamiferizados (por ejemplo, humanizados), anticuerpos recombinantes o sintéticos, y anticuerpos híbridos y monocatenarios.

Tanto los anticuerpos policlonales como monoclonales son obtenibles por inmunización con los efectores inmunitarios o fragmentos antigénicos de los mismos y cualquier tipo es utilizable para inmunoensayos. Los métodos de obtención de ambos tipos de sueros son muy conocidos en la técnica. Los sueros policlonales son menos preferidos, pero se preparan relativamente fácilmente mediante inyección de un animal de laboratorio adecuado con una cantidad eficaz del efector inmunitario, o parte antigénica del mismo, recogiendo suero del animal y aislando sueros específicos por cualquiera de las técnicas inmunoabsorbentes conocidas. Aunque los anticuerpos producidos por este método son utilizables en prácticamente cualquier tipo de inmunoensayo, están generalmente menos favorecidos debido a la posible heterogeneidad del producto.

El uso de anticuerpos monoclonales en un inmunoensayo es particularmente preferido debido a la capacidad para producirlos en grandes cantidades y la homogeneidad del producto. La preparación de líneas celulares de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales derivados fusionando una línea celular inmortal y linfocitos sensibilizados contra la preparación inmunogénica puede hacerse por técnicas que son muy conocidas para aquellos que son expertos en la materia.

Otro aspecto de la presente invención contempla, por tanto, un método de detección de un efector inmunitario en una muestra que comprende células inmunitarias de un sujeto, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra o una alícuota de dicha muestra con un anticuerpo específico para dicho efector inmunitario o fragmento antigénico del mismo durante un tiempo y en condiciones suficientes para que se forme un complejo anticuerpo-efector, y luego detectar dicho complejo.

Una muestra incluye sangre completa. Este método incluye micro-matrices y macro-matrices sobre soportes sólidos planos o esféricos.

- 5 Están disponibles una amplia variedad de técnicas de inmunoensayo como puede apreciarse por referencia a las patentes de EE.UU. N° 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653.

10 Lo siguiente es una descripción de un tipo de ensayo. Un anticuerpo sin marcar se inmoviliza sobre un sustrato sólido y la muestra que va a probarse para los efectores inmunitarios (por ejemplo, antígenos) se pone en contacto con la molécula unida. Después de un periodo de incubación adecuado, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno, un segundo anticuerpo específico para el antígeno, marcado con una molécula indicadora capaz de producir una señal detectable, se añade entonces y se incuba, dejándolo un tiempo suficiente para la formación de otro complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo marcado. Cualquier material sin tratar se elimina lavando, y la presencia del antígeno se determina por observación de una señal producida por la molécula indicadora. Los resultados pueden tanto ser cualitativos, por simple observación de la señal visible, como pueden cuantificarse comparando con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de antígeno. Esta técnica generalizada es muy conocida para aquellos expertos en la materia ya que sería cualquiera de varias variaciones.

20 En estos ensayos, un primer anticuerpo que tiene especificidad por los presentes efectores inmunitarios es cualquiera covalentemente o pasivamente unido a una superficie sólida. La superficie sólida normalmente es vidrio o un polímero, siendo los polímeros más comúnmente usados celulosa, poli(acrilamida), nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de recipientes, perlas, esferas, discos de microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procesos de unión son muy conocidos en la técnica y generalmente consisten en reticular, unir covalentemente o adsorber físicamente el complejo de polímero-anticuerpo se lava en la preparación para la muestra de prueba. Una alícuota de la muestra que va a probarse se añade entonces al complejo de fase sólida y se incuba durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, 2-120 minutos o si es más conveniente, durante la noche) y bajo condiciones adecuadas (por ejemplo, durante aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C) para permitir la unión de cualquier subunidad presente en el anticuerpo. Tras el periodo de incubación, la fase sólida de subunidad del anticuerpo se lava y se seca y se incuba con un segundo anticuerpo específico para una porción del antígeno. El segundo anticuerpo está asociado a una molécula indicadora que se usa para indicar la unión del segundo anticuerpo al hapteno.

35 Hay muchas variaciones a este ensayo. Una variación particularmente útil es un ensayo simultáneo en el que todos o muchos de los componentes se mezclan sustancialmente simultáneamente.

40 Por "molécula indicadora", como se usa en la presente memoria descriptiva, se indica una molécula que, por su naturaleza química, proporciona una señal analíticamente identificable que permite la detección de antígeno-anticuerpo unido. La detección puede ser tanto cualitativa como cuantitativa. Las moléculas indicadoras más comúnmente usadas en este tipo de ensayo son tanto enzimas, fluoróforos como moléculas que contienen radionúclidos (es decir, radioisótopos) y moléculas quimioluminiscentes. Ejemplos de fluoróforos adecuados se proporcionan en la Tabla 2. En el caso de un inmunoensayo enzimático, una enzima se conjuga con el segundo anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído o peryodato. Como se reconocerá fácilmente, sin embargo, existe una amplia variedad de diferentes técnicas de conjugación, que están fácilmente disponibles para el experto. 45 Enzimas comúnmente usadas incluyen peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos que van a usarse con las enzimas específicas se eligen generalmente para la producción, tras la hidrólisis por la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, que dan un producto fluorescente en vez de los sustratos cromogénicos indicados anteriormente. En todos los casos, la enzima-anticuerpo marcado se añade al primer complejo de anticuerpo-antígeno, se deja que se una, y a continuación se elimina lavando el exceso reactivo. Una solución que contiene el sustrato apropiado se añade entonces al complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El sustrato reaccionará con la enzima enlazada al segundo anticuerpo, dando una señal visual cualitativa, que puede cuantificarse adicionalmente, normalmente espectrofotométricamente, para dar una indicación de la cantidad de antígeno que estaba presente en la muestra. 50 De nuevo, la presente invención se extiende a un ensayo sustancialmente simultáneo.

60 Alternativamente, los compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activan por iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía de la luz, induciendo un estado para la excitabilidad en la molécula, seguido de emisión de la luz a un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Se dejó que el anticuerpo marcado fluorescente se uniera al primer complejo de anticuerpo-antígeno. Después de eliminar lavando el reactivo sin unir, el complejo terciario restante expuesto entonces a la luz de la longitud de onda la fluorescencia apropiada observada indica la presencia del antígeno de interés. Las técnicas de inmunofluorescencia y EIA están ambas muy establecidas en la materia y son 65 particularmente preferidas para el presente método. Sin embargo, también pueden emplearse otras moléculas indicadoras, tales como moléculas de radioisótopo, quimioluminiscentes o bioluminiscentes.

Hay otros varios sistemas de detección que pueden emplearse, que incluyen oro coloidal y todos aquellos sistemas de detección están englobados por la presente invención.

- 5 La presente invención también contempla ensayos genéticos tales como aquellos que implican análisis por RT-PCR u otras estrategias basadas en amplificación conocidas en la técnica para detectar productos de expresión de ARN de una secuencia genética que codifica un efector inmunitario.

10 En una realización se realiza PCR usando pares de cebadores, uno o ambos de los cuales están generalmente marcados con la misma molécula indicadora o una diferente capaz de dar una señal distinguible. El uso de fluoróforos es particularmente útil en la práctica de la presente invención. Ejemplos de fluoróforos adecuados pueden seleccionarse de la lista dada en la Tabla 2. Otras marcas incluyen luminiscencia y fosforescencia, además de colorantes de infrarrojos. Estos colorantes o fluoróforos también pueden usarse como moléculas indicadoras para anticuerpos.

15 Cualquier método adecuado de análisis de la emisión de fluorescencia está englobado por la presente invención. A este respecto, la invención contempla técnicas que incluyen, pero no se limitan a, espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo de 2 fotones y 3 fotones como se desvela, por ejemplo, por Lakowicz et al., *Biophys. J.*, 72: 567, 1997, obtención de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia como se desvela, por ejemplo, por Eriksson et al., *Biophys. J.*, 2:64, 1993, y transferencia de energía por resonancia de fluorescencia como se desvela, por ejemplo, por Youvan et al., *Biotechnology* 3:1-18, 1997.

20 La luminiscencia y la fosforescencia pueden resultar respectivamente de una marca luminiscente o fosforescente adecuada como se conoce en la técnica. A este respecto puede usarse cualquier medio óptico de identificación de tal marca.

25 La radiación infrarroja puede resultar de un colorante infrarrojo adecuado. Colorantes infrarrojos a modo de ejemplo que pueden emplearse en la invención incluyen, pero no se limitan a, los desvelados en Lewis et al., *Dyes Pigm.*, 42(2):197, 1999, Tawa et al., *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 488 [Electrical, Optical and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials IV], 885-890, Daneshvar et al., *J. Immunol. Methods*, 226(1-2):119-128, 1999, Rapaport et al., *Appl. Phys. Lett.*, 74(3):329-331, 1999 y Durig et al., *J. Raman Spectrosc.*, 24(5):281-285, 1993. Puede emplearse cualquier método espectroscópico de infrarrojos adecuado para interrogar al colorante infrarrojo. Por ejemplo, a este respecto puede usarse espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier como se describe, por ejemplo, por Rahman et al., *J. Org. Chem.*, 63:6196, 1998.

35 Adecuadamente, la dispersión electromagnética puede resultar de difracción, reflexión, polarización o refracción de la radiación electromagnética incidente que incluye luz y rayos X. Tal dispersión puede usarse para cuantificar el nivel de ARNm o nivel de proteína.

40 La citometría de flujo es particularmente útil en el análisis de la emisión de fluoróforos.

45 Como se conoce en la técnica, la citometría de flujo es una técnica de alto rendimiento que implica analizar rápidamente las características físicas y químicas de partículas (por ejemplo, ARNm marcado, ADN o proteínas) a medida que pasan a través de la trayectoria de uno o más haces de láser mientras que están suspendas en una corriente de fluido. A medida que cada partícula intercepta el haz de láser, la luz dispersada y la luz fluorescente emitida por cada célula o partícula, se detecta y se registra usando cualquier algoritmo de seguimiento adecuado como, por ejemplo, se describe en lo sucesivo.

50 Un citómetro de flujo moderno es capaz de realizar estas tareas hasta 100.000 células/partículas s^{-1} . Mediante el uso de una matriz óptica de filtros y espejos dicróicos pueden separarse y detectarse simultáneamente diferentes longitudes de onda de luz fluorescente. Además, pueden usarse varios láseres con diferentes longitudes de onda de excitación. Por tanto, puede usarse varios fluoróforos para dirigir y examinar, por ejemplo, diferentes efectores inmunitarios dentro de una muestra o efectores inmunitarios de múltiples sujetos.

55 Citómetros de flujo adecuados que pueden usarse en los métodos de la presente invención incluyen aquellos que miden de cinco a nueve parámetros ópticos (véase la Tabla 3) usando un único láser de excitación, comúnmente un láser refrigerado con aire de ión argón que opera a 15 mW en su línea espectral de 488 nm. Citómetros de flujo más avanzados son capaces de usar múltiples láseres de excitación tales como un láser de HeNe (633 nm) o un láser de HeCd (325 nm), además del láser de ión argón (488 o 514 nm).

60 Por ejemplo, Biggs et al., *Cytometry*, 36:36-45, 1999, han construido un citómetro de flujo de 11 parámetros usando tres láseres de excitación y han demostrado el uso de nueve fluoróforos distinguibles, además de mediciones de dispersión frontal y lateral para fines de inmunofenotipar (es decir, clasificar) partículas. El máximo número de parámetros comercialmente disponibles es actualmente 17: detector de dispersión frontal, detector de dispersión lateral y tres láseres de excitación cada uno con cinco detectores de fluorescencia. Si todos los parámetros pueden usarse adecuadamente o no depende mucho de los coeficientes de extinción, rendimientos cuánticos y cantidad de

65

solapamiento espectral entre todos los fluoróforos (Malemed et al., "Flow cytometry and sorting", 2ª Ed., New York, Wiley-Liss, 1990). Sin embargo, se entenderá que la presente invención no está limitada a ningún citómetro de flujo particular o cualquier conjunto particular de parámetros. A este respecto, la invención también contempla usar en lugar de un citómetro de flujo convencional un citómetro de flujo microfabricado como se desvela, por ejemplo, por Fu et al., Nature Biotechnology, 17: 1109-1111, 1999.

El ensayo de la presente invención puede ser automatizado o semi-automatizado para el cribado de alto rendimiento o para cribar varios efectores inmunitarios del sujeto. La automatización se controla convenientemente por software informático.

Aunque no es según la invención como se ha reivindicado, otra realización podría ser un producto de programa informático, para evaluar la presencia o ausencia o el nivel de uno o más efectores inmunitarios, comprendiendo dicho producto:

(1) código que recibe, como valores de entrada, la identidad de una molécula indicadora asociada a un ARNm marcado o anticuerpo:

(2) código que compara dichos valores de entrada con valores de referencia para determinar el nivel de moléculas indicadoras y/o la identidad de la molécula con la que la molécula indicadora está unida; y

(3) un medio legible por ordenador que guarda los códigos.

En otra realización, el producto de programa comprende además código que recibe como información de entrada la referente a la altura de la muestra en el tubo de ensayo. En algunas realizaciones, la información identifica un recipiente de prueba que comprende una muestra que tiene una forma que se encuentra fuera de una o más dimensiones predeterminadas. En algunas realizaciones, la información puede estar en forma de una señal que informa de la detección de una muestra (y el recipiente de prueba correspondiente) en la que la altura de la muestra supera al menos aproximadamente 12 mm u otro valor corregido para diferentes muestras. En otra realización, la información puede estar en forma de una señal que informa de la detección de una muestra en la que la altura de la muestra es inferior a aproximadamente 6 mm u otro valor corregido para diferentes muestras.

Aunque no es según la invención como se reivindica, otra realización podría ser un ordenador para evaluar la presencia o ausencia o nivel de uno o más efectores inmunitarios, comprendiendo dicho ordenador:

(1) un medio de almacenamiento de datos legible por máquina que comprende un material de almacenamiento de datos codificado con datos legibles por máquina, en el que dichos datos legibles por máquina comprenden valores de entrada que identifican una molécula indicadora asociada a un ARNm marcado o anticuerpo;

(2) una memoria de trabajo para guardar instrucciones para procesar dichos datos legibles por máquina;

(3) una unidad de procesamiento central acoplada a dicha memoria de trabajo y a dicho medio de almacenamiento de datos legible por máquina, para procesar dichos datos legibles por máquina para comparar dichos valores para proporcionar una evaluación de la identidad o nivel de moléculas indicadoras o de moléculas a las que están unidas; y

(4) un hardware de salida acoplado a dicha unidad de procesamiento central, para recibir los resultados de la comparación.

Una versión de estas realizaciones se presenta en la Figura 1, que muestra un sistema 10 que incluye un ordenador 11 que comprende una unidad de procesamiento central ("CPU") 20, una memoria de trabajo 22 que puede ser, por ejemplo, RAM (memoria de acceso aleatorio) o memoria de "núcleos", memoria de almacenamiento masivo 24 (tal como una o más unidades de disco o unidades de CD-ROM), uno o más terminales de visualización de tubo de rayo catódico ("CRT") 26, uno o más teclados 28, una o más líneas de entrada 30 y una o más líneas de salida 40, todos los cuales están interconectados por un bus bidireccional de sistema convencional 50.

El hardware de entrada 36, acoplado al ordenador 11 por líneas de entrada 30, puede implementarse en varias formas. Por ejemplo, los datos legibles por máquina de la presente invención pueden entrarse mediante el uso de un módem o módems 32 conectados por una línea telefónica o línea de datos dedicada 34. Alternativamente o adicionalmente, el hardware de entrada 36 puede comprender CD. Alternativamente, también puede usarse la unidad de ROM o las unidades de disco 24 conjuntamente con el terminal de visualización 26, teclado 28 como dispositivo de entrada.

El hardware de salida 46, acoplado al ordenador 11 por líneas de salida 40, puede implementarse similarmente por dispositivos convencionales. A modo de ejemplo, el hardware de salida 46 puede incluir terminal de visualización CRT 26 para visualizar una secuencia de polinucleótidos sintética o una secuencia de polipéptidos sintética como se describe en el presente documento. El hardware de salida también podría incluir una impresora 42, de manera que

podiera producirse la salida de copia impresa, o una unidad de disco 24, para guardar la salida del sistema para el uso posterior.

En operación, la CPU 20 coordina el uso de los diversos dispositivos de entrada y salida 36,46 coordina accesos de datos del almacenamiento masivo 24 y accede a y desde la memoria de trabajo 22, y determina la secuencia de etapas de procesamiento de datos. Pueden usarse varios programas para procesar los datos legibles por máquina de la presente invención. Programas a modo de ejemplo pueden usar, por ejemplo, las siguientes etapas:

(1) entrar valores de entrada que identifican una molécula indicadora asociada a un ARNm marcado o anticuerpo;

(2) evaluar, que incluye comparar, dichos valores de entrada con valores de referencia para determinar el nivel de molécula indicadora y/o la identidad de la molécula con la que la molécula indicadora está unida; y

(3) generar los resultados de la evaluación.

La Figura 2 muestra una sección transversal de un medio de almacenamiento de datos magnético 100 que puede codificarse con datos legibles por máquina, o conjunto de instrucciones, para evaluar el nivel de un efector inmunitario que puede llevarse a cabo por un sistema tal como el sistema 10 de la Figura 1. El medio 100 puede ser un disquete convencional o disco duro, que tiene un sustrato 101 adecuado, que puede ser convencional, y un recubrimiento 102 adecuado, que puede ser convencional, sobre uno o ambos lados, que contiene dominios magnéticos (no visibles) cuya polaridad u orientación puede alterarse magnéticamente. El medio 100 también puede tener una abertura para recibir el eje de una unidad de disco u otro dispositivo de almacenamiento de datos 24. Los dominios magnéticos de recubrimiento 102 del medio 100 están polarizados u orientados de manera que codifiquen de manera que puedan ser datos legibles por máquina convencionales para la ejecución por un sistema tal como el sistema 10 de la Figura 1.

La Figura 3 muestra una sección transversal de un medio de almacenamiento de datos ópticamente legible 110 que también puede codificarse con tales datos legibles por máquina, o conjunto de instrucciones, para diseñar una molécula sintética de la invención, que puede llevarse a cabo por un sistema tal como el sistema 10 de la Figura 1. El medio 110 puede ser una memoria solo de lectura de disco compacto convencional (CD-ROM) o un medio reescribible tal como un disco magneto-óptico, que es ópticamente legible y magneto-ópticamente escribible. El medio 100 tiene preferentemente un sustrato 111 adecuado, que puede ser convencional, y un recubrimiento 112 adecuado, que puede ser convencional, normalmente de un lado del sustrato 111.

En el caso de CD-ROM, como es muy sabido, el recubrimiento 112 es reflectante y está impreso con una pluralidad de hoyos 113 para codificar los datos legibles por máquina. La disposición de hoyos se lee reflejando la luz láser fuera de la superficie del recubrimiento 112. Un recubrimiento protector 114, que preferentemente es sustancialmente transparente, se proporciona encima del recubrimiento 112.

La presente invención contempla adicionalmente kits para evaluar la capacidad de un sujeto para crear una respuesta celular según los métodos descritos en el presente documento. El kit está convenientemente en forma compartimental con uno o más compartimentos adaptados para recibir una muestra de un sujeto tal como sangre completa preferentemente recogida por muestreo capilar, tal como por un dispositivo de punción. Así, en algunas realizaciones, el kit comprende un dispositivo adecuado para el muestreo capilar tal como un dispositivo que pincha o perfora la piel para permitir el sangrado de capilares periféricos. Los recipientes para recibir una muestra pueden tener las mismas dimensiones uniformes o pueden comprender una pluralidad de dimensiones. En algunas realizaciones, los recipientes para recibir muestras están marcados o se disponen de otro modo de forma que la altura de la muestra en los recipientes pueda evaluarse. Los recipientes también pueden adaptarse para contener un anticoagulante en el que la muestra es sangre completa con o sin un azúcar simple, tal como dextrosa, para mantener la capacidad funcional eficaz de las células inmunitarias.

Generalmente, el kit está en una forma que está envasado para venta con un conjunto de instrucciones. Las instrucciones generalmente estarían en forma de un método de medición de una respuesta CMI en un sujeto, comprendiendo dicho método recoger una muestra de dicho sujeto en el que dicha muestra comprende células del sistema inmunitario que son capaces de producir moléculas efectoras inmunitarias tras la estimulación por un antígeno, incubar dicha muestra con un antígeno en condiciones en las que la forma y la muestra comprendan una dimensión que ha sido optimizada y entonces opcionalmente medir la presencia o elevación en el nivel de una molécula efectora inmunitaria en el que la presencia o nivel de dicha molécula efectora inmunitaria es indicativa de la capacidad de dicho sujeto para crear una respuesta inmunitaria mediada por células.

Convenientemente, el kit comprende además un dispositivo de muestreo capilar y/o una estufa de incubación. En algunas realizaciones, la sangre se recoge usando un tubo capilar de aproximadamente 3-4 mm de diámetro.

En algunas realizaciones, el sujeto del que se obtiene la muestra, es un sujeto humano, tal como un sujeto pediátrico, adulto o geriátrico. Cualquier animal o ave puede ser un sujeto.

Aunque la molécula efectora inmunitaria ilustrada es IFN- γ , otras citocinas tales como TNF α y GM-CSF se ensayan fácilmente, ya que son componentes del sistema del complemento, perforinas, defensinas, catelicidinas, granzimas, ligando Fas, ligando CD-40, exotaxina, citotoxinas, quimiocinas o monocinas. En algunas realizaciones, las células inmunitarias probadas están seleccionadas de un linfocito citolítico (NK) espontáneo, linfocito T, linfocito B, macrófago o monocito.

En algunas realizaciones, el kit comprende un antígeno que está seleccionado de un auto-antígeno, un antígeno de un organismo patógeno, un metal o antígeno inorgánico, o un antígeno tumoral o un análogo del mismo. En algunas realizaciones, el antígeno es de *Mycobacterium* tal como, pero no se limita a, ESAT-6, CFP-10 y TB7. En otras realizaciones, el antígeno probado es el toxoide tetánico (TT) o derivado de proteína purificada (PPD) de *M. tuberculosis* o *M. avium*.

Como se describe en relación con el método, el recipiente está seleccionado para proporcionar la forma de muestra óptima durante la etapa de incubación. En algunas realizaciones, el recipiente de incubación forma una altura de muestra de al menos aproximadamente 4 mm a 6 mm a una altura máxima de aproximadamente 12 mm a 20 mm. En otras realizaciones se prefiere una altura de muestra de al menos aproximadamente 6 mm a un máximo de aproximadamente 12 mm. En algunas realizaciones, el recipiente de incubación forma una altura de muestra de 4 mm, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm, 11 mm, 12 mm, 13 mm, 14 mm, 15 mm, 16 mm, 17 mm, 18 mm, 19 mm o 20 mm o una altura intermedia. En otras realizaciones, el recipiente de incubación forma una altura de muestra de 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm, 11 mm o 12 mm o una altura intermedia. En relación con el volumen de muestra en el recipiente de incubación, la muestra incubada tiene un volumen inferior a 500 μ l, por ejemplo, inferior a 400 μ l, inferior a 300 μ l, inferior a 200 μ l, inferior a 100 μ l, o inferior a 50 μ l. En otras realizaciones, la muestra es sangre capilar y la muestra incubada tiene un volumen de aproximadamente 400 μ l, 300 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 50 μ l o 40 μ l o un volumen intermedio.

En algunas realizaciones, el kit comprende reactivos para detectar IFN- γ y éstos incluyen un conjugado de anticuerpo para detectar IFN- γ .

Aunque no es según la invención como se reivindica, otra realización podría ser un método de tratamiento de un sujeto que tiene una infección por patógenos, un trastorno autoinmunitario o cáncer o una propensión a desarrollar un trastorno tal, comprendiendo dicho método evaluar la capacidad de dicho sujeto para crear una respuesta inmunitaria mediada por células por el método de medición de una respuesta CMI en un sujeto, comprendiendo dicho método recoger una muestra de dicho sujeto opcionalmente por muestreo capilar en el que dicha muestra comprende células del sistema inmunitario que son capaces de producir moléculas efectoras inmunitarias tras la estimulación por un antígeno, incubar dicha muestra en un recipiente de incubación con un antígeno en condiciones en las que la forma de la muestra comprenda una dimensión que ha sido optimizada y entonces medir la presencia de o elevación en el nivel de una molécula efectora inmunitaria, en el que la presencia o nivel de dicha molécula efectora inmunitaria es indicativo de la capacidad de dicho sujeto para crear una respuesta inmunitaria mediada por células y después seleccionar un protocolo terapéutico adecuado. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre. En algunas realizaciones, la forma de la muestra comprende una altura de al menos 6 mm a un máximo de aproximadamente 12 mm. En otras realizaciones, el volumen de muestra es 0,01 ml. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal de ganado o sujeto humano o aviar. El recipiente de incubación de la invención es adecuado para mantener una forma óptima de la muestra, en el que la forma tiene una o dos dimensiones seleccionadas de: (i) un diámetro circular máximo inferior a 6 mm; y (ii) una altura de al menos aproximadamente 4 mm a 6 mm a una altura máxima de aproximadamente 12 mm a 20 mm, en el que el volumen de muestra total incubado es inferior a 500 μ l.

Aunque no es según la invención como se reivindica, otra realización podría ser un método de optimización de una respuesta inmunitaria mediada por células *in vitro*, comprendiendo el método: i) incubar una pluralidad de muestras celulares que tienen un intervalo de diferentes alturas u otras dimensiones en recipientes de incubación, en el que la muestra celular comprende células que secretan una molécula efectora inmunitaria tras la estimulación por un agente (tal como un antígeno, hapteno o mitógeno) con el agente *in vitro* durante un tiempo y en condiciones suficientes para que las células secreten la molécula efectora inmunitaria; y ii) medir la presencia o nivel de la molécula efectora inmunitaria de cada muestra; y iii) identificar la dimensión de la muestra que proporciona la respuesta celular óptima. En algunas realizaciones, la dimensión es la altura de la muestra en el recipiente de incubación. En otra realización, la dimensión es el volumen de la muestra en el recipiente de incubación. En otras realizaciones, la dimensión es el diámetro circular máximo de la muestra en el recipiente de incubación.

La presente invención se describe adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Detección de molécula efectora inmunitaria en pequeños volúmenes de muestra incubados con antígeno

Se recogió sangre completa de donantes sanos (cuatro donantes) en tubos de Li-heparina Vacuette de 9 ml que tenían una forma cilíndrica con 6,6 mm de diámetro y una base en forma de U. Se estimularon alícuotas de 0,1, 0,2,

0,3, 0,4 y 0,5 ml de sangre en tubos Mini-Collect de Vacuette (sin aditivo). La sangre se estimuló usando toxoide tetánico y fitohemaglutinina-P (mitógeno). El volumen de antígeno añadido a cada tubo fue proporcional al volumen de sangre, por ejemplo, se estimularon 0,1 ml de sangre con 0,01 ml de antígeno; se estimularon 0,4 ml de sangre con 0,04 ml de antígeno.

5 Las respuestas de IFN- γ generadas en pequeños volúmenes de sangre se compararon con las respuestas generadas usando 1 ml de sangre en un tubo de extracción de sangre 13/75 de Vacuette (control).

10 La sangre se incubó con antígeno durante entre 16 y 24 horas a 37 °C antes de eliminar el plasma para la detección de IFN- γ (QuantiFERON-TB Gold ELISA). Solo se ensayaron 25 μ l de plasma para las muestras de 0,1 ml debido a que se obtuvo muestra insuficiente.

15 La prueba de ELISA demostró que IFN- γ se produjo en volúmenes de sangre de tan solo 0,1 ml (véase la Tabla 3). Los resultados dentro del recipiente de 6,6 mm de diámetro para 0,3-0,4 ml de sangre en respuesta a antígeno fueron similares a 1 ml de control para cada sujeto en un recipiente redondo de 11 mm de diámetro. Los resultados del mitógeno estuvieron menos afectados en los volúmenes y fueron similares de 0,1 ml a 0,5 ml, que indica menos necesidad de optimizar el volumen con las proporciones de recipiente.

20 Según la presente invención, pueden lograrse respuestas celulares óptimas como se miden por la producción de citocinas o mecanismos efectores adicionales en pequeños volúmenes (tales como aquellos obtenibles por muestreo por punción) en tanto que se realice la pre-optimización del recipiente; una vez se sabe que esto es posible, la optimización puede hacerse por un experto en la materia.

25 Ejemplo 2

Detección de molécula efectora inmunitaria en un pequeño volumen de sangre completa incubada en recipientes que tienen diferentes formas internas

30 Se dispensó sangre heparinizada en alícuotas de 3 x 5 ml en tubos de polipropileno. Se añadió el antígeno, tanto citomegalovirus (CMV) humano como toxoide tetánico (tétanos), a la sangre a concentraciones apropiadas. Cada tubo se mezcló minuciosamente y la sangre (50 μ l) se dispensó en diversos recipientes en los que el volumen de sangre adoptó diferentes alturas. Específicamente, tubos de PCR (cónicos a 10 mm de altura con diámetro máximo de 5 mm, base en forma de U), recipientes MiniCollect (cilíndricos con 6,5 mm de diámetro, base en forma de U), placa de 96 pocillos (cilíndrica con 6,5 mm de diámetro, base plana) y placa de 48 pocillos (cilíndrica con 11 mm de diámetro, base plana). Los recipientes se incubaron durante 20 horas a 37 °C antes de extraer el plasma (20 μ l) para probar por QFT-ELISA que detecta la producción de IFN- γ usando un anticuerpo marcado. En un experimento de control se incubó 1 ml de sangre en un recipiente cilíndrico (diámetro interno de 10,5 mm, base plana) y se probaron 20 μ l de plasma por QFT-ELISA. Los resultados se muestran en la Tabla 4 en la que IFN- γ en UI/ml se muestra para el antígeno nulo (Nulo), toxoide tetánico (TT) y citomegalovirus (CMV). Las respuestas de 0,20 UI/ml y por encima de Nulo son significativas. La altura del volumen de sangre y el diámetro circular máximo en los diferentes recipientes también se muestran en la Tabla 4. La fuerte señal se detecta en los sujetos 1, 3, 4 y 5 con CMV y/o TT para alturas de muestra de 11,5 mm y 6 mm. La señal cae para CMV, ya que la altura baja por debajo de 6 mm a 3 mm y luego a 1,5 mm. Por consiguiente, una muestra de sangre completa de 15 μ l proporciona una fuerte señal, siempre que este volumen de sangre se incuba en un recipiente apropiado que proporcione una altura de muestra de al menos aproximadamente 4 mm.

50 Ejemplo 3

Detección de molécula efectora inmunitaria en sangre capilar periférica

55 Se recogió sangre capilar (150 μ l) por punción del dedo en un tubo MiniCollect de litio-heparina. Se transfirió un pequeño volumen (50 μ l) a tres tubos de PCR. Los tubos de PCR eran cónicos que tenían una porción superior cilíndrica decreciente durante 10 mm hasta una base cónica. Se añadieron el antígeno que era CMV o toxoide tetánico (Tétanos) o sin antígeno (Nulo) a los tubos que se incubaron durante 20 horas a 37 °C. A partir de aquí, se extrajo el plasma (20 μ l) y se probó usando QFT-ELISA. Como se muestra en la Tabla 5, la muestra del sujeto de control positiva para CMV (TR) generó una señal significativa en comparación con controles negativos que indican que el ensayo puede realizarse con volúmenes tan pequeños como 50 μ l de sangre capilar.

60 Ejemplo 4

Detección de moléculas efectoras inmunitarias desde 6 mm de altura y hasta 18 mm de altura

65 Se incubó sangre humana heparinizada de diferentes volúmenes con antígeno (sin antígeno (Nulo), toxoide tetánico (TT) o citomegalovirus (CMV)) en tres tipos de recipientes que proporcionan una altura de sangre de 11,5 mm, 18 mm y 6 mm. El plasma se probó en QFT-ELISA. Los resultados (véase la Tabla 6) muestran de nuevo eficacia hasta

6 mm. Los resultados también muestran resultados positivos con el tubo cónico de 18 mm que indica que la molécula efectora inmunitaria se produce a alturas de muestra de por encima de 18 mm, sin embargo los resultados óptimos se logran entre 5 y 18 mm.

5 Los resultados mostrados en la Figura 3 se volvieron a tabular en la Tabla 8 proporcionando también las alturas de las diversas muestras de sangre. Aquí puede observarse que se produce una señal reducida a medida que la altura de muestra aumenta de 16 mm hacia arriba. Los resultados del mitógeno se han eliminado de la Tabla 3 en la Tabla 8 debido a que PHA-P no es un estimulante específico, mientras que el toxoide tetánico requiere procesamiento y presentación de antígeno celular.

10 **Ejemplo 5**

Detección de molécula efectora inmunitaria hasta 4 mm y 20 µl de sangre completa

15 Se probó sangre humana heparinizada de diferentes volúmenes: 50 µl, 40 µl, 30 µl, 20 µl y 10 µl en pequeños tubos de PCR proporcionando alturas de muestra de 6 mm, 5,5 mm, 5 mm, 4 mm y 2,5 mm, respectivamente. Los antígenos fueron: sin antígeno (N), toxoide tetánico (TT) y citomegalovirus (CMV) a concentración apropiada. La sangre se incubó a 37 °C durante 20 horas y se extrajo el plasma para probar por QFT-ELISA. Un experimento de control (Tabla 7, Continuación) usando cultivos de 1 ml usó pequeños volúmenes de plasma (50 µl, 40 µl, 30 µl, 20 µl, 15 µl, 10 µl y 5 µl) para probar por QFT-ELISA. Los resultados mostrados en la Tabla 7 muestran una señal positiva hasta 20 µl de sangre con una altura de 4 mm, aunque los resultados óptimos se encontraron a 5,5 y 6 mm.

25 Aquellos expertos en la materia apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible a variaciones y modificaciones distintas de aquellas específicamente descritas. Debe entenderse que la invención incluye todas aquellas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos citados o indicados en esta memoria descriptiva, individualmente o conjuntamente, y todas y cada una de las combinaciones de dos cualesquiera o más de dichas etapas o características.

30 **TABLA 1**

Lista de fluoróforos adecuados		
Sonda	Ex¹ (nm)	Em² (nm)
Sondas reactivas y conjugadas		
Hidroxycumarina	325	386
Aminocumarina	350	455
Metoxicumarina	360	410
Cascade Blue	375; 400	423
Lucifer Yellow	425	528
NBD	466	539
R-Ficoeritrina (PE)	480; 565	578
Conjugados de PE-Cy5	480; 565; 650	670
Conjugados de PE-Cy7	480; 565; 743	767
Conjugados de APC-Cy7	650; 755	767
Red 613	480; 565	613
Fluoresceína	495	519
FluorX	494	520
BODIPY-FL	503	512
TRITC	547	574
X-Rodamina	570	576
Rodamina B de lisamina	570	590
PerCP	490	675
Texas Red	589	615
Alofococianina (APC)	650	660
TruRed	490,675	695
Alexa Fluor 350	346	445
Alexa Fluor 430	430	545
Alexa Fluor 488	494	517
Alexa Fluor 532	530	555
Alexa Fluor 546	556	573
Alexa Fluor 555	556	573
Alexa Fluor 568	578	603

Alexa Fluor 594	590	617
Alexa Fluor 633	621	639
Alexa Fluor 647	650	688
Alexa Fluor 660	663	690
Alexa Fluor 680	679	702
Alexa Fluor 700	696	719
Alexa Fluor 750	752	779
Cy2	489	506
Cy3	(512); 550	570;(615)
Cy3.5	581	596; (640)
Cy5	(625); 650	670
Cy5.5	675	694
Cy7	743	767
Sondas de ácido nucleico		
Hoeschst 33342	343	483
DAPI	345	455
Hoechst 33258	345	478
SYTOX Blue	431	480
Cromomicina A3	445	575
Mitramicina	445	575
YOYO-1	491	509
SYTOX Green	504	523
SYTOX Orange	547	570
Bromuro de etidio	493	620
7-AAD	546	647
Naranja de acridina	503	530/640
TOTO-1, TO-PRO-1	509	533
Naranja de tiazol	510	530
Yoduro de propidio (PI)	536	617
TOTO-3, TO-PRO-3	642	661
LDS 751	543; 590	712; 607
Proteínas fluorescentes		
Y66F	360	508
Y66H	360	442
EBFP	380	440
No mutante	396, 475	50, 503
GFPuv	385	508
ECFP	434	477
Y66W	436	485
S65A	471	504
S65C	479	507
S65L	484	510
S65T	488	511
EGFP	489	508
EYFP	514	527
DsRed	558	583
Otras sondas		
Monoclorobimano	380	461
Calceína	496	517
¹ Ex: Longitud de onda de excitación pico (nm)		
² Em: Longitud de emisión de excitación pico (nm)		

TABLA 2

Parámetros ópticos a modo de ejemplo que pueden medirse por un citómetro de flujo.			
Parámetro	Acrónimo	Ángulo de detección del haz de láser incidente	Longitud de onda (nm)
Luz dispersada frontal	FS	2-5°	488*
Luz dispersada lateral	SS	90°	488*

ES 2 558 543 T3

Fluorescencia "verde"	FL1	90°	510-540 [†]
Fluorescencia "amarilla"	FL2	90°	560-580 [†]
Fluorescencia "roja"	FL3	90°	>650 [#]
* usando un láser de excitación a 488 nm † anchura del filtro paso banda # filtro de paso largo			

TABLA 3

Optimización del recipiente pequeño para la estimulación de sangre (6,6 mm de diámetro interno)

Volumen de sangre (ml)	Sujeto 1			Sujeto 2			Sujeto 3			Sujeto 4		
	Nulo	TT	Mit	Nulo	TT	Mit	Nulo	TT	Mit	Nulo	TT	Mit
0.1	0,11#	1,31#	2,44#	0,37#	4,2#	42,57*#	0,21#	0,17#	13,93#	0,08#	0,99#	40,39*#
0.2	0,16	4,88	3,82	0,06	24,03	42,57*	0,14	1,14	17,02	0,07	6,1	40,39*
0.3	0,16	10,13	2,72	0,07	42,57*	42,57*	0,15	1,72	8,74	0,08	14,37	40,39*
0.4	0,15	10,45	3,29	0,05	42,57*	42,57*	0,12	4,01	8,82	0,08	12,11	40,39*
0.5	0,19	3,29	3,11	0,18	42,57*	42,57*	0,11	3,15	12,21	0,08	6,36	40,39*
Control	0,32	11,51	4,91	1,51	42,57*	42,57*	0,24	4,37	19,93	0,09	9,01	40,39*

Nulo = PBS solo, TT = Toxide tetánico, Mit = Mitógeno (PHA-P)
 * = Resultado fuera de escala
 # = Solo estuvieron disponibles 25 µl de plasma para la prueba (resultado corregido 2X mostrado)

TABLA 4

Sujeto	Antígeno	Tubo de PCR (50 µl de cultivo, 20 µl en EIA)	MiniCollect (50 µl de cultivo, 20 µl en EIA)	Placa de 96 pocillos (50 µl de cultivo, 20 µl en EIA)	Placa de 48 pocillos (50 µl cultivo, 20 µl en EIA)	Control (1 ml de cultivo, 50 µl en EIA)	Control (1 ml de cultivo, 20 µl en EIA)	
		Cónico hasta 10 mm de altura con diámetro máximo de 5 mm, base en forma de U	Cilíndrico con 6,5 mm de diámetro, base en forma de U	Cilíndrico con 6,5 mm de diámetro, base plana	Cilíndrico con 11 mm de diámetro, base plana	Cilíndrico con 10,5 mm de diámetro, base plana (gel)		
		Altura de la sangre = 6 mm	Altura de la sangre = 3 mm	Altura de la sangre = 1,5 mm	Altura de la sangre = 0,5 mm	Altura de la sangre = 11,5 mm		
1	Nulo	0,13	0,03	0,87	0,06	0,02	0,02	
	TT	5,82	4,26	0,39	0,39	12,16	12,16	
	CMV	3,72	1,99	1,07	0,97	6,24	3,92	
2	Nulo	0,07	0,02	0,05	0,04	0,02	0,02	
	TT	0,34	0,96	0,15	0,27	1,30	0,81	
	CMV	0,05	0,02	0,05	0,05	0,02	0,02	
3	Nulo	0,09	0,02	0,05	0,05	0,03	0,02	
	TT	12,16	12,16	12,16	12,16	12,16	12,16	
	CMV	7,38	1,31	0,69	0,56	12,16	7,83	
4	Nulo	0,14	0,05	0,10	0,07	0,05	0,04	
	TT	0,86	0,44	0,37	0,21	5,31	3,26	
	CMV	0,07	0,05	0,12	0,06	0,05	0,04	
5	Nulo	0,08	0,07	5,50	0,11	0,03	0,04	
	TT	2,34	0,58	0,18	0,15	7,87	5,00	
	CMV	0,22	0,10	0,11	0,12	0,12	0,11	

La comparación es con 1 ml usando 20 µl de plasma.
Se muestran los resultados de IFN-gamma en UI/ml en respuesta a Nulo, antígeno del CMV o toxoide tetánico.

TABLA 5

5

<i>Sangre capilar</i>			
Sujeto	IFN-gamma (UI/ml)		
	Nulo	CMV	Tétanos
TR	0,22	27,07	-
JH	0,12	-	0,4

TABLA 6

<i>Volumen variable de cultivo en tubos de PCR</i>				
Se muestran los resultados de IFN-gamma en UI/ml en respuesta a Nulo, antígeno del CMV o toxoide tetánico				
Sujeto	Antígeno	1 ml de control		
		Cilíndrico 11,5 mm de altura de la sangre	300 µl Cónico * 18 mm de altura de la sangre	50 µl Cónico * 6 mm de altura de la sangre
1	N	0,10	0,11	0,17
	TT	5,51	3,99	4,66
	CMV	2,68	2,98	1,84
2	N	0,11	0,12	0,06
	TT	0,35	0,49	0,70
	CMV	0,11	0,10	0,12
3	N	0,07	0,10	0,08

ES 2 558 543 T3

	TT	13,81	13,07	9,28
	CMV	3,00	3,93	1,79
4	N	0,05	0,10	0,08
	TT	1,09	1,16	0,60
	CMV	0,08	0,10	0,10
5	N	0,04	0,04	0,06
	TT	0,54	0,21	0,14
	CMV	0,07	0,06	0,07

20 µl de plasma ensayados en cada caso

Muestra la eficacia de la muestra hasta 6 mm de altura y 50 µl

* Los tubos disminuyen gradualmente hasta 10 mm altura y a continuación son cilíndricos hasta 20 mm de altura. El diámetro del tubo en la sección cilíndrica es 5 mm.

TABLA 7
Cultivo de bajo volumen variable
 Se muestran los resultados de IFN-gamma en UI/ml en respuesta a Nulo, antígeno del CMV o toxoide tetánico
 Tubos de PCR (cónicos hasta 10 mm de altura con diámetro máximo de 5 mm)

Sujeto	Antígeno	50 µl de cultivo (25 µl de plasma en EIA)	40 µl de cultivo (20 µl de plasma en EIA)	30 µl de cultivo (15 µl de plasma en EIA)	20 µl de cultivo (10 µl de plasma en EIA)	10 µl de cultivo (5 µl de plasma en EIA)
		Altura de la sangre = 6 mm	Altura de la sangre = 5,5 mm	Altura de la sangre = 5 mm	Altura de la sangre = 4 mm	Altura de la sangre = 2,5 mm
1	N	0,14	0,07	0,04	0,05	0,05
	TT	6,05	5,96	3,62	1,98	0,08
	CMV	3,37	3,59	1,79	1,22	1,11
2	N	0,04	0,05	0,12	0,05	0,13
	TT	1,82	0,25	0,30	0,23	0,13
	CMV	0,04	0,05	0,06	0,05	0,07
3	N	0,05	0,05	0,06	0,02	2,52
	TT	14,28	14,28	9,97	2,04	0,41
	CMV	2,39	2,75	0,39	0,74	0,26
4	N	0,09	0,07	0,07	0,06	0,06
	TT	0,25	0,47	0,36	0,08	0,09
	CMV	0,07	0,07	0,08	0,07	0,10
5	N	0,06	0,04	0,06	0,03	0,05
	TT	0,49	0,48	0,16	0,09	0,04
	CMV	0,04	0,06	0,04	0,02	0,04

TABLA 7 Continuación
1 ml de control (cilíndricos con 10,5 mm de diámetro)

Sujeto	Antígeno	Altura de la sangre = 11,5 mm											
		1 µl de cultivo (50 µl de plasma en EIA)	1 µl de cultivo (40 µl de plasma en EIA)	1 µl de cultivo (30 µl de plasma en EIA)	1 µl de cultivo (25 µl de plasma en EIA)	1 µl de cultivo (20 µl de plasma en EIA)	1 µl de cultivo (15 µl de plasma en EIA)	1 µl de cultivo (10 µl de plasma en EIA)	1 µl de cultivo (5 µl de plasma en EIA)				
1	N	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03
	TT	13,48	13,48	13,48	13,48	13,48	13,48	13,48	13,48	13,48	13,48	13,48	3,40
2	CMV	8,04	7,40	6,59	5,72	4,64	4,19	2,82	1,99	2,82	4,19	2,82	1,99
	N	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03	0,04	0,02	0,02	0,03	0,04
3	TT	0,95	0,80	0,67	0,58	0,52	0,45	0,35	0,33	0,45	0,45	0,35	0,33
	CMV	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,04	0,02	0,03	0,03	0,04
4	N	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03
	TT	14,28	14,28	14,28	14,28	14,28	14,28	14,28	14,28	14,28	14,28	14,28	14,28
5	CMV	9,16	6,97	6,36	6	5,3	4,84	3,77	2,13	4,84	3,77	2,13	2,13
	N	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
5	TT	3,98	3,49	3,02	2,43	2,07	1,69	1,17	0,08	1,69	1,17	0,08	0,08
	CMV	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,04
5	N	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02
	TT	0,98	0,9	0,79	0,69	0,59	0,47	0,37	0,22	0,59	0,47	0,37	0,22
5	CMV	0,08	0,08	0,07	0,07	0,07	0,06	0,05	0,04	0,07	0,06	0,05	0,04

TABLA 8
Volumen variable de cultivo en tubos MiniCollect (R) (Greiner Bio-One)

Altura de la sangre	Sujeto	Antígeno	4 mm		8 mm		12 mm		16 mm		20 mm		1 ml de control (50 µl ensayados)
			100 µl (25 µl ensayados)	0,11	200 µl	300 µl	400 µl	500 µl					
1		N	0,11	0,16	0,16	0,16	0,15	0,19	0,32	11,51	1,51	42,57	0,24
		TT	1,31	4,88	10,13	10,45	3,29	11,51					
2		N	0,37	0,06	0,07	0,05	0,18	1,51	42,57	0,24	4,37	0,05	1,09
		TT	4,20	24,03	42,57*	42,57	42,57						
3		N	0,21	0,14	0,15	0,12	0,11	0,24	4,37	0,05	1,09	6,36	1,09
		TT	0,17	1,14	1,72	4,01	3,15						
4		N	0,08	0,07	0,08	0,08	0,08	0,11	4,37	0,05	1,09	6,36	1,09
		TT	0,99	6,10	14,37	12,11	6,36						

* indica el máximo para ese ciclo, el valor real es >

Indica los valores máximos obtenidos con antígeno de proteína (excluyendo el control)

N = Nulo, TT=toxoides tetánico añadido

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul et al., Nucl. Acids Res., 25:3389, 1997.
- 5 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15.
- Ausubel (Ed) Current Protocols in Molecular Biology, 5th Edition, John Wiley & Sons, Inc, NY, 2002.
- Biggs et al., Cytometry, 36:36-45, 1999.
- Bonner et al., Eur. J. Biochem., 46:83, 1974.
- Brock et al., Int. J. Tuberc. Lung. Dis, 5(5):462-467, 2001.
- 10 Daneshvar et al., J. Immunol. Methods, 226(1-2):119-128, 1999.
- Durig et al., J. Raman Spectrosc., 24(5):281-285, 1993.
- Eriksson et al., Biophys. J., 2:64, 1993.
- Erickson et al., Science, 249: 527-533, 1990.
- Fu et al., Nature Biotechnology, 17: 1109-1111, 1999.
- Hodgson, Bio/Technology, 9:19-21, 1991.
- 15 Kurrek, Eur. J. Biochem., 270:1628-1644, 2003.
- Lakowicz et al., Biophys. J., 72: 567, 1997.
- Lewis et al., Dyes Pigm., 42(2):197, 1999.
- Maleded et al., "Flow cytometry and sorting", 2nd Ed., New York, Wiley-Liss, 1990.
- 20 Mannur et al., J. Mol. Biol., 5:109, 1962.
- Rahman et al., J. Org. Chem., 63: 6196, 1998.
- Rapaport *et al.*, *Appl. Phys. Lett.*, 74(3):329-331, 1999.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990, Mack Publishing, Company, Easton, PA, U.S.A.
- Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, CSHLP, CSH, NY, 2001.
- Skjot et al., Injection and Immunity, 68(1):214-20, 2000.
- 25 Summerton et al., Antisense and Nucleic acid Drug Development, 7:187-195, 1997.
- Tawa et al., Mater. Res. Soc. Symp. Proc., 488 [Electrical, Optical and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials IV], 885-890.
- Wells, Methods Enzymol., 202:2699-2705, 1991.
- 30 Youvan et al., Biotechnology. 3:1-18, 1997.

REIVINDICACIONES

1. Un método de medición de una respuesta inmunitaria mediada por células (CMI) en una muestra de sangre completa recogida de un sujeto, en el que dicha muestra de sangre completa comprende células del sistema inmunitario que son capaces de producir moléculas efectoras inmunitarias tras la estimulación por un antígeno, comprendiendo el método:
- 5 a) incubar una muestra de sangre completa de un capilar periférico o de una arteria o una vena de un sujeto con un antígeno en un recipiente de incubación sin dilución de la muestra, en donde la forma de la muestra en el recipiente tiene las siguientes dimensiones: (i) un diámetro circular máximo inferior a 6 mm; y (ii) una altura de al menos 4 mm a 6 mm a una altura máxima de 12 mm a 20 mm; en donde el volumen de muestra total incubado es inferior a 500 µl; y
- 10 b) detectar o medir la presencia o la elevación en el nivel de una molécula efectora inmunitaria o de una molécula de ácido nucleico capaz de producir una molécula efectora indicativa de la capacidad del sujeto para crear una respuesta inmunitaria mediada por células.
- 15 2. El método de la reivindicación 1 que comprende otra etapa de seleccionar un protocolo terapéutico para el tratamiento de un sujeto que tiene síntomas de una patología inflamatoria, una infección por patógenos, un trastorno autoinmunitario, inmuno-incompetencia, alergia o cáncer o una propensión a desarrollar un trastorno tal.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la recogida es a) con un dispositivo de muestreo capilar; o b) en un recipiente que contiene antígeno y/o anticoagulante o en el que el antígeno y/o el anticoagulante se añaden después a la sangre.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en el que el anticoagulante es heparina.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa de incubación se realiza en presencia de un azúcar simple, tal como dextrosa.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra de sangre completa se incuba con el antígeno durante de 4 horas a 50 horas.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que a) el volumen de muestra total incubado es inferior a 400 µl, inferior a 300 µl, inferior a 200 µl, inferior a 100 µl, o inferior a 50 µl; o b) la muestra es sangre capilar y el volumen total incubado es 400 µl, 300 µl, 200 µl, 100 µl, 50 µl o 40 µl.
- 35 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende: (i) mezclar sangre completa en el recipiente de incubación; (ii) incubar la muestra de sangre completa con un antígeno y con un antígeno de control o un mitógeno; (iii) centrifugar el recipiente de incubación y recoger plasma; y (iv) detectar una molécula efectora inmunitaria en plasma.
- 40 9. El método de la reivindicación 8, en el que la recogida es en un tubo capilar de 3-4 mm de diámetro.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la forma de la muestra tiene un volumen inferior a 400 µl.
- 45 11. Un kit para medir una respuesta inmunitaria mediada por células (CMI) en una muestra de sangre completa recogida de un sujeto, en donde dicha muestra de sangre completa comprende células del sistema inmunitario que producen moléculas efectoras inmunitarias tras la estimulación por un antígeno, comprendiendo el kit:
- 50 (a) uno o más recipientes de incubación adecuados para contener o incubar una muestra de sangre completa de capilares periféricos o sangres venosa o arterial completas, en donde la forma de la muestra en el recipiente tiene las siguientes dimensiones: (i) un diámetro circular máximo inferior a 6 mm; y (ii) una altura de al menos 4 mm a 6 mm a una altura máxima de 12 mm a 20 mm; en donde el volumen de muestra total incubado es inferior a 500 µl;
- 55 (b) uno o más antígenos de prueba para el análisis de respuestas CMI *in vitro* contra los mismos y un antígeno de control;
- (c) reactivos para medir la presencia o la elevación en el nivel de una molécula efectora inmunitaria, en donde los reactivos comprenden un conjugado de anticuerpo para detectar interferón-γ (IFN-γ); y
- 60 (d) un conjunto de instrucciones que comprende cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento.
12. Un kit de la reivindicación 11 que comprende además un tubo capilar de 3-4 mm de diámetro.
- 65 13. El kit de las reivindicaciones 11 o 12 que comprende además un dispositivo de muestreo capilar.

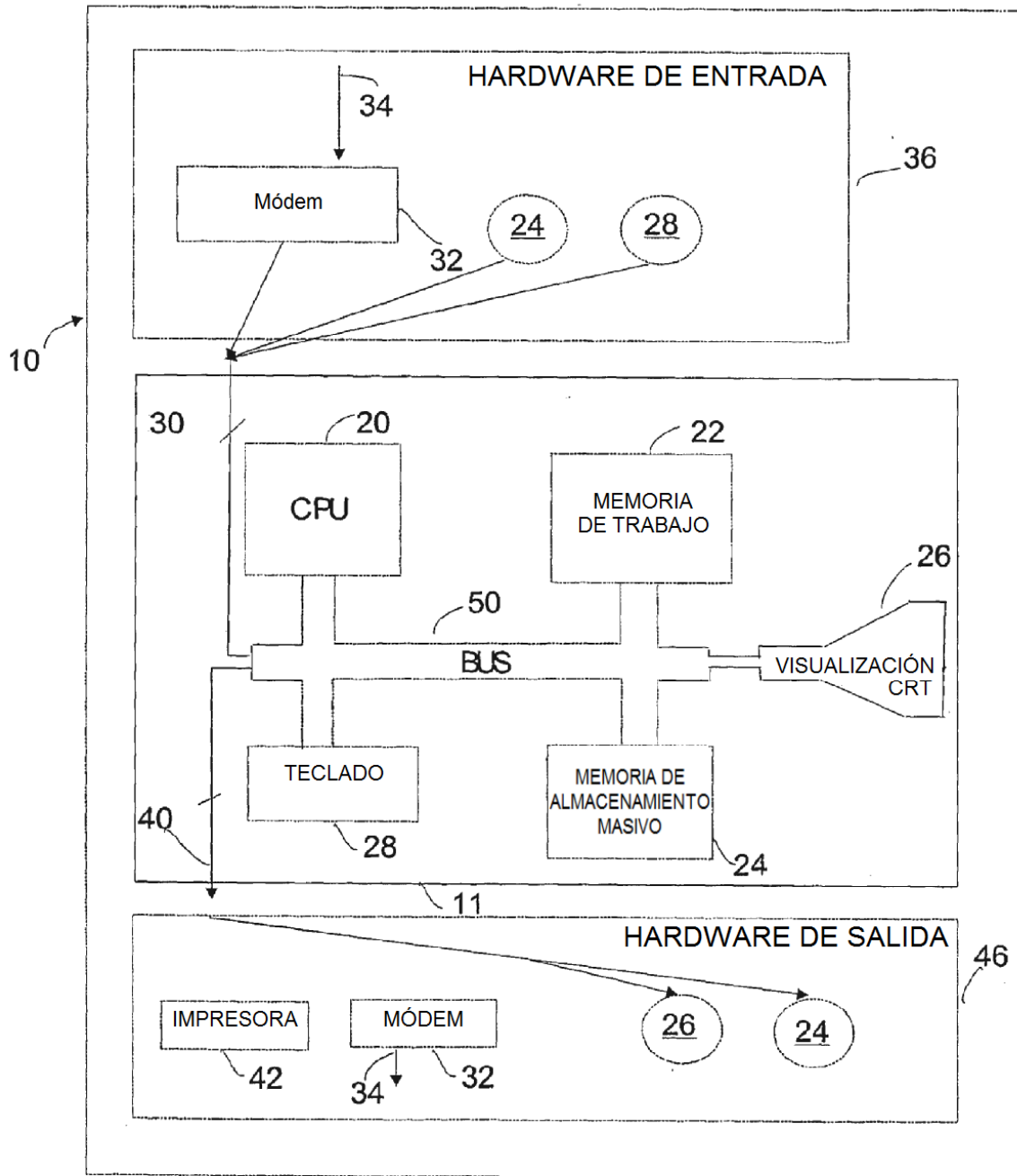


Figura 1

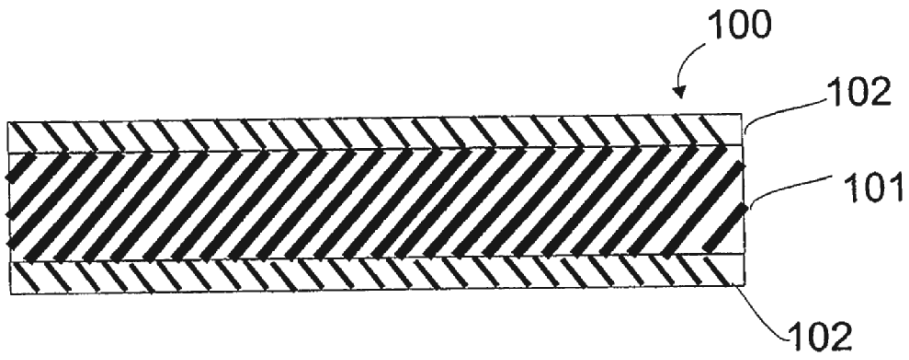


Figura 2

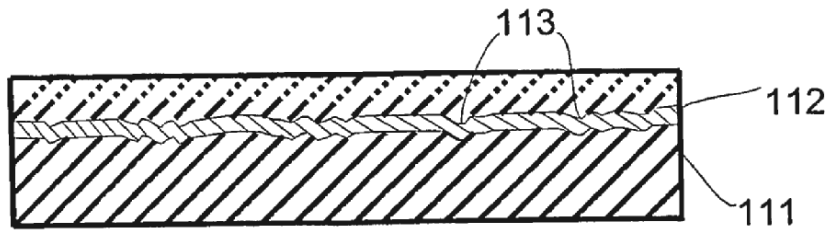


Figura 3