

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 857**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/84** (2006.01)

**G01N 33/15** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2011 PCT/US2011/034051**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO2011139733**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2011 E 11777937 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2564204**

54 Título: **Aparato de medición del sistema inmunitario y de oxígeno y de cribado de fármacos**

30 Prioridad:

**27.04.2010 US 328409 P**

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

**10.05.2017**

73 Titular/es:

**SOFER, SAMIR (100.0%)  
158 Princeton Street  
Nutley, New Jersey 07110-1128, US**

72 Inventor/es:

**SOFER, SAMIR**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 611 857 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

Aparato de medición del sistema inmunitario y de oxígeno y de cribado de fármacos

5 **Antecedentes de la invención**

El sistema inmunitario y de oxígeno es una parte vital de las funciones del cuerpo y un mecanismo de defensa contra dolencias y enfermedades para animales y seres humanos. En realidad cualquier ser vivo, incluyendo plantas y microorganismos utiliza un sistema interno para combatir la tensión y la adversidad. La capacidad de este sistema para responder a una enfermedad, suministrar energía a los tejidos, desintoxicar el cuerpo contra la contaminación y fármacos, llevar a cabo señalización neuromuscular, etc., varía de un individuo a otro y de un día a otro en el mismo individuo. Este sistema se denominará brevemente en el presente documento "el sistema inmunitario".

Por ejemplo, un paciente que padece hepatitis C, cáncer, otra enfermedad, o incluso una tensión física o psicológica, puede tener un sistema inmunitario cargado. Ciertos fármacos de inmunoterapia diseñados para reforzar o modular el sistema inmunitario, tales como Interferón para hepatitis C, o citoquinas y/o células T activadas para cáncer, ayudan al sistema inmunitario del individuo a combatir una enfermedad dada. El interferón, por ejemplo, puede ayudar a un individuo a combatir la hepatitis C. Sin embargo, no todos los individuos responden en la misma medida a inmunoterapia.

La distinción entre respuestas a inmunoterapia se demostró en un estudio clínico para evaluar pacientes de hepatitis C en tratamiento con Interferón, según lo aprobado por la Junta de Revisión Institucional de la University of Medicine and Dentistry de New Jersey. En un resumen de este estudio, la existencia de pacientes que no responden al tratamiento con interferón de pacientes de hepatitis C es bien conocida. Una revisión es facilitada por el Dr. William M. Lee en la University of Texas Southwestern Medical School. El Dr. Lee y colegas en nueve instituciones más trabajaron en el estudio HALT-C de 2002-2007. Este estudio señala que hay un 50-60 % de pacientes que no responden al tratamiento con interferón más ribavirina. Estos pacientes que no responden tampoco responden además a estrategias de mantenimiento con interferón a largo plazo en el sentido de que no existe ninguna diferencia significativa en la velocidad de progresión de enfermedad hepática entre pacientes que no responden a interferón y pacientes que no responden no en mantenimiento con Interferón. La pregunta que surge a partir de este trabajo es: ¿Por qué existe una diferencia entre pacientes que responden y pacientes que no responden?

Hinshaw, Sofer y colaboradores (Am. J. Physiol Heart Cir. Phys: H742-750 (1980)) descubrieron cuando estudiaban un sistema de recirculación de sangre extracorpóreo en modelos caninos de choque endotóxico, que la tensión cortante generada por el sistema de circulación de bomba extracorpórea causaba autoanticoagulación. Esto es, la sangre sometida a tensión no se coagulaba, en ausencia de anticoagulantes externos tales como heparina, incluso en un sistema de circulación de sangre agitada vigorosamente. Además aislaron, a partir de sangre sometida a tensión, HLF, un factor similar a heparina (por favor, véase la referencia a bNOS a continuación), que demostró prevenir la coagulación. Hinshaw y colaboradores (Circ. Shock 1979; 6(3)261-9) también observaron que dicha sangre sometida a tensión en cánidos condujo a una 'cura' en los perros, los perros autoanticoagulados, eran resistentes al choque cuando se les inyectaba la endotoxina bacteriana.

El inventor de la presente, Sofer, se centró en este problema como Docente Investigador en Biotecnología Financiado por el Estado de Nueva Jersey, y descubrió MOP, o picos de oxígeno molecular (no especies de radical oxígeno) que emanan de sangre que se generaron a partir de sangre sometida a tensión (Comparative Haematology International (1999) 9:68-71). Otros trabajos publicados basados en miles de series por el grupo de NJIT Biotecnology de Sofer refuerzan la presencia de picos de oxígeno generados por muchos otros tipos de tensión: química, térmica, pH, etc. Las preguntas que surgen en este contexto son: ¿De dónde viene el oxígeno de los MOP, en vista del hecho de que los MOP se generan a partir de sangre a concentración de oxígeno nula, donde el contenido de oxígeno en equilibrio de hemoglobina es cero? ¿Por qué la tensión libera este oxígeno? ¿Por qué refuerza la tensión el sistema inmunitario contra el ataque por endotoxinas bacterianas? Estas preguntas no fueron aclaradas por estos investigadores. McKenna C: "An investigation of the Oxygraphic Response of Stressed Bovine Blood", mayo de 1997 consideró los MOP en sangre sometida a tensión.

Aunque el grupo de Sofer reconoció la posibilidad de que la sonda que usaron para las mediciones de oxígeno también pueda leer el óxido nítrico o H<sub>2</sub>S u otros compuestos, no consideraron la acción combinada de oxígeno con estos compuestos, ni postularon la existencia de reservorios de NO, u otros.

En una exhaustiva revisión de la bibliografía del NO, Pieper (Hypertension. 1998; 31: 1047-1060.) Galen M. Pieper, Review of Alterations in Endothelial Nitric Oxide Production in Diabetes) no enseña que el oxígeno o el NO u otros están presentes en reservorios, ni propone sus acciones combinadas. Además, esta revisión no consigue considerar las tasas de cambio de las concentraciones de estos materiales en función del tiempo, es decir, las pendientes de curvas relacionadas con velocidades de reacción. Pieper señala la falta de resultados concluyentes de la ciencia del NO con respecto a muchas de las enfermedades fundamentales.

65

Maltepe y Sougstad (Maltepe, Emin; Saugstad, Ola Didrik, Oxygen in Health and Disease: Regulation of Oxygen Homeostasis-Clinical Implications Pediatric Research: marzo de 2009 - Volumen 65 - Número 3 - págs. 261-268) ofrecen una revisión detallada del papel del oxígeno en la salud y la enfermedad. No consideran el oxígeno o el NO u otros reservorios, o sus acciones combinadas.

Sofer, S "ROX and BOX: new tools for detecting patient injury and drug toxicity" presentado en el World Pharma Congress el 15 de julio de 2010 describe conceptos relativos a reservorios de oxígeno. El documento US 7.025.734B1 desvela un alambre guía con capacidades de detección química que puede detectar niveles de NO y/o superóxido y puede usarse para análisis in vivo de la salud vascular. El documento EP-A-1110562 desvela un aparato para un riñón artificial que comprende un monitor de medición para medir de forma continua el óxido nítrico como componente del fluido corporal.

Por lo tanto, existe una necesidad de una manera de evaluar o cuantificar la capacidad del sistema inmunitario de un individuo para mantener a raya la enfermedad y para responder a fármacos que refuerzan el sistema inmunitario, tales como interferón.

### Sumario de la invención

La invención se define en la reivindicación independiente 1. Características opcionales o preferidas se describen en las reivindicaciones dependientes.

Lo siguiente presenta un sumario simplificado, para proporcionar una comprensión básica de algunos aspectos de la divulgación.

De acuerdo con sus aspectos fundamentales e indicado brevemente, un aspecto de la presente divulgación incluye un método que comprende las etapas de: proporcionar al menos un sensor; proporcionar una muestra que incluye una cantidad de fluido o material corporal con una cantidad de material de señalización; determinar un valor inicial para dicha cantidad de material de señalización; introducir una tensión en dicha muestra; determinar, mediante dicho sensor, un valor para ROX en dicha muestra; y determinar, mediante dicho sensor, un valor para BOX en dicha muestra. Además, el presente método incluye la etapa de determinar cambios de concentraciones de ROX y BOX a lo largo del tiempo.

La presente divulgación incluye además un aparato. En un aspecto, el aparato comprende: una sonda óptica y una sonda de membrana conectada de forma operativa a un procesador para calcular un valor para ROX y un valor para BOX en una muestra dada. El procesador calcula, además, tasas de cambio en concentraciones de ROX y BOX a lo largo del tiempo. Estas tasas de cambio se muestran mediante pendientes representativas.

La presente divulgación incluye además un método para controlar las concentraciones de ROX y BOX, que comprende las etapas de: proporcionar al menos un sensor; proporcionar una muestra u organismo que incluye una cantidad de material corporal con una cantidad de material de señalización; determinar un valor inicial para dicha cantidad de material de señalización; introducir una tensión en dicha muestra u organismo; determinar, mediante dicho sensor, un valor para ROX en dicha muestra u organismo; determinar, mediante dicho sensor, un valor para BOX en dicha muestra u organismo; e introducir un material de control o de bloqueo en dicha muestra u organismo, que puede ser un paciente, donde dicho material de control es capaz de alterar dicho valor para ROX o dicho valor para BOX en dicha muestra u organismo.

Además, la presente divulgación incluye un método para predecir la aparición de rechazo a un trasplante de órgano o a un fármaco, que comprende las etapas de: proporcionar al menos un sensor; proporcionar una muestra procedente de un paciente que pretende someterse a un tratamiento, que incluye una cantidad de material corporal con una cantidad de material de señalización; determinar un valor inicial para dicha cantidad de material de señalización; introducir una tensión en dicha muestra, donde dicha tensión incluye una cantidad de material de tratamiento, y donde dicho material de tratamiento es un material que es fundamental para dicho tratamiento; determinar, mediante dicho sensor, un valor para ROX en dicha muestra; y determinar, mediante dicho sensor, un valor para BOX en dicha muestra.

Éstas y otras características y sus ventajas serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia de evaluación de la salud y la disposición para tratamiento médico a partir de una lectura cuidadosa de la Descripción detallada de aspectos preferidos, acompañada por los siguientes dibujos.

### Breve descripción de los dibujos

En las figuras,

La figura 1 es una representación esquemática de un sistema biológico de acuerdo con un aspecto;

La figura 2 es un diagrama esquemático que ilustra las etapas de un método para medir concentraciones de ROX y BOX en la muestra de sangre de un paciente que está siendo monitorizado de acuerdo con un aspecto;

La figura 3 es un diagrama esquemático que ilustra las etapas de un método para predecir la toxicidad de un fármaco dado u otra tensión de acuerdo con un aspecto

La figura 4 ilustra una posibilidad para obtener un acontecimiento SOX a través de etapas de un método de acuerdo con un aspecto;

5 La figura 5 es una representación esquemática de un Immunogram™ (inmunograma) de acuerdo con un aspecto;

La figura 6 es un gráfico que muestra una sucesión típica de series en un aparato de análisis de acuerdo con un aspecto;

10 La figura 7 es un gráfico que indica una segunda sucesión de series para establecer reproducibilidad del aparato de análisis, y para demostrar la toxicidad de anticoagulante ACD (ácido-citrato-dextrosa) de acuerdo con un aspecto; y

La figura 8 es un gráfico que muestra dos series que indican una tasa de BOX máxima y datos de punto de inflexión determinados por un aparato de análisis de acuerdo con un aspecto.

## 15 Descripción detallada de aspectos preferidos

La presente divulgación proporciona un método para determinar el estado del sistema inmunitario de un individuo aparentemente sano para resistir ataques, un método para determinar la respuesta de un paciente a y la capacidad de responder a inmunomoduladores, o sustancias que refuerzan o modifican el rendimiento del sistema inmunitario, como parte de inmunoterapia para combatir enfermedades tales como hepatitis C, y un método de ajuste de la dosificación de inmunomoduladores, particularmente aquellos que pueden ser tóxicos en dosificaciones mayores. La presente divulgación es, además, un método para determinar información del estado de salud general que incluye el potencial de un individuo para tolerar y superar tensiones internas y externas.

25 La presente divulgación proporciona un método y un aparato para cuantificar la capacidad del sistema inmunitario de un individuo para mantener a raya la enfermedad y para ser ayudado a este respecto por fármacos de refuerzo inmunitario o moduladores tales como interferón. La presente divulgación también puede aplicarse al sistema nervioso, sistemas de desintoxicación, sistema muscular, y sistema de producción y transferencia de energía de una persona.

30 Cuando se usa con un patrón interno, este método y aparato también pueden utilizarse para cuantificar la toxicidad y los efectos fisiológicos de potenciales futuros fármacos, así como otros productos químicos. Tal como se usa en el presente documento "patrón interno" puede ser cualquier material adecuado que pueda ser un reflejo de o exhibir las propiedades o cualidades de una muestra que está siendo ensayada. Por ejemplo, el material conocido como MedX™, que se deriva de sangre bovina, es un patrón interno adecuado para comparación con muestras de sangre de pacientes para fines de la presente divulgación. De forma importante, el uso de un patrón interno, tal como MedX™, facilita el rastreo del historial y la autenticidad de una muestra. Por ejemplo, si una muestra es destruida, y el patrón interno relacionado también es destruido, puede suponerse que tanto el patrón interno como la muestra fueron sometidos a manipulación errónea o tensiones ambientales similares.

40 Los métodos y el aparato desvelados también pueden usarse para evaluar la utilidad de biomarcadores. Además, el método y aparato desvelados también pueden usarse para determinar el estado de salud global de un individuo, que incluye proporcionar información en cuanto a la resistencia de un individuo respecto a la capacidad para recibir y superar tensión, enfermedad y terapia farmacológica.

45 Sin desear quedar limitados por la teoría, se cree que el oxígeno, o moléculas que contienen oxígeno, tales como óxido nítrico y otras moléculas de señalización del sistema inmunitario o corporales, tales como sulfuro de hidrógeno y otros, denominados todos en el presente documento "materiales de señalización", es una herramienta significativa y potente en la defensa del cuerpo contra productos químicos y organismos extraños invasores. El almacenamiento y la liberación de cantidades abundantes de materiales de señalización, particularmente oxígeno, forma una parte fundamental del sistema inmunitario del cuerpo.

50 Sin embargo, los materiales de señalización, tales como oxígeno, son solubles en plasma, por ejemplo, a concentraciones muy bajas. Por lo tanto, el cuerpo debe transportar materiales de señalización en forma móvil, embalada, a las ubicaciones que lo necesitan, tales como cortes, tumores, y tejidos que requieren elevadas cantidades de energía. Esta forma embalada de materiales de señalización se denomina el reservorio de oxígeno (ROX). Tal como se usa en el presente documento, el término "ROX" significa moléculas de oxígeno, así como otros materiales de señalización, que incluyen NO y H<sub>2</sub>S, que están en forma embalada o empaquetada para administración eficaz a través de la sangre.

60 Los términos "empaquetado" y "embalado" se usan de forma intercambiable, y se refieren a cualquier medio, tal como fuerzas electromagnéticas o envoltura con proteínas, mediante el cual las células en la sangre, que incluyen glóbulos blancos, concentran materiales de señalización, tales como oxígeno y NO, en una forma que es transportable en la sangre para uso por los sistemas, tales como el sistema inmunitario, en el cuerpo. La medición de ROX es una medición de la viabilidad inmunitaria innata del paciente y cómo responderá el paciente inmediatamente a un tratamiento o fármaco dado. Cuando el ROX se somete a tensión, se liberan moléculas de

oxígeno desde la forma empaquetada. Tal como se usa en el presente documento, "tensión" se define como cualquier factor, ya sea físico, químico, electromagnético u otro, que altera el estado de equilibrio existente de la sangre. Además, la tensión puede ser una única tensión completa, tal como una dosificación de tratamiento completo de un fármaco, una tensión parcial, tal como una dosificación de tratamiento parcial, o una tensión que se administra más de una vez a lo largo del tiempo, tal como una dosificación completa de un fármaco de tratamiento que se administra múltiples veces durante un periodo de tiempo.

El ROX en la sangre o en los tejidos es el indicador de reservas de materiales de señalización disponibles en la sangre y se indica que es una medida de la capacidad innata de una persona para proporcionar oxígeno u otros materiales corporales importantes para un ataque por productos químicos y organismos extraños invasores. Además de servir como agente de señalización para la respuesta a dicho ataque, el ROX, que es liberado al cuerpo por la tensión, suministra materiales de señalización a tejidos necesitados, por ejemplo, de energía. Más allá de simplemente una medición de hemoglobina, que indica en general el oxígeno disponible actualmente en la sangre arterial, el ROX es una medición de reservorios de oxígeno, NO y H<sub>2</sub>S, así como los reservorios de otros materiales de señalización, que están presentes en todos los componentes de la sangre, incluyendo plasma y glóbulos rojos. Además, la presente divulgación puede usarse para analizar cualquier fluido corporal, incluyendo líquido cefalorraquídeo, que contenga reservorios de materiales de señalización.

Se afirma, además, que la sangre u otros materiales de oxígeno y señalización celular, que se denominarán en el presente documento "BOX", es también un indicador de la capacidad de adaptación del sistema inmunitario. Tal como se usa en el presente documento, "BOX" es una medición de la capacidad de consumo oxidativo celular de sangre, es decir, la velocidad a la que el oxígeno, el NO, u otros materiales de señalización, se consumen, incluyendo ser empaquetados o embalados, que se refiere a la velocidad a la que ROX se prepara para entrada en la sangre. Por lo tanto, BOX es también una medición de la fuerza de adaptación del sistema inmunitario de un paciente, o la capacidad de las células sanguíneas para construir capacidad para materiales de señalización y para reforzar el suministro de materiales de señalización para uso por el cuerpo. Monitorizando los niveles de BOX, se puede rastrear la respuesta de un paciente al tratamiento durante un periodo de tiempo más largo. BOX también proporciona la dosis a la que se desencadena el cambio inmunitario y puede ser útil para determinar la dosificación apropiada de medicamento.

Se cree que las personas y los animales que tienen un desequilibrio en las concentraciones normales de ROX y BOX en sangre (por favor, véase las figuras 6 y 7), que son medibles, son más susceptibles a la enfermedad y responden menos eficazmente a fármacos que refuerzan el sistema inmunitario tales como interferón. Por lo tanto, las mediciones precisas de la concentración de ROX y BOX pueden ser de valor clínico y de diagnóstico para enfermedades en animales y seres humanos, en los que el sistema inmunitario y el estado de salud general son motivo de preocupación. Tal como se usa en el presente documento, el término "desequilibrio" se refiere a un nivel de BOX, ROX o, en general, material de señalización que es mayor o menor que el que está dentro de un intervalo normal, basándose en datos obtenidos de individuos u otros organismos vivos que están en un estado libre de enfermedades, relajado o no sometido a tensión y normal. Se cree que un organismo vivo sano que no esté siendo sometido a una tensión interna o externa tiene un intervalo normal de valores para BOX y ROX.

Se afirma, además, que una concentración intensamente elevada de materiales de señalización, tales como oxígeno, durante un periodo de tiempo excepcionalmente largo, también es requerida por el cuerpo. Este fenómeno se denomina SOX, por un acontecimiento superoxidativo. El SOX puede ser generado por células sanguíneas así como otros tejidos, tales como islotes pancreáticos. Un acontecimiento SOX típico es detectable tras un brusco incremento del nivel de materiales de señalización en un fluido corporal particular. Por ejemplo, un acontecimiento SOX puede incluir un estallido muy grande de NO, con un estallido a intervalos de O<sub>2</sub>, acompañado por otros fuertes indicadores de la respuesta inmunitaria, tales como lactoferrina y mieloperoxidasa. Este escenario sería excepcionalmente eficaz en la lucha contra el cáncer o el SIDA o patógenos en el campo de batalla de los ganglios linfáticos. Si, a modo de ejemplo, se pudiera desencadenar un acontecimiento SOX, los glóbulos blancos asociados con el empaquetamiento de materiales de señalización podrían ser devueltos a la propia sangre, fluidos corporales o materiales del paciente para uso para combatir realmente una enfermedad o problema corporal.

Adicionalmente, la presente divulgación contempla un método para instigar o producir un acontecimiento SOX en un fluido o material, que no es necesario que sea el fluido o material corporal poseído por el paciente en cuestión. En el caso de que los materiales corporales de un paciente sean demasiado débiles o generalmente incapaces de producir un acontecimiento SOX, un método de la presente divulgación incluye las etapas de: 1) proporcionar un fluido o material adecuado que sería aceptado por el sistema inmunitario de un paciente; 2) provocar un acontecimiento SOX; y 3) administrar el material capaz de SOX al paciente. Este método permitiría a un paciente soportar y superar mejor una enfermedad, terapia farmacológica, u otras tensiones, basándose en la capacidad adquirida de esa persona para producir acontecimientos SOX dentro del cuerpo.

Adicionalmente, la medición de los niveles de materiales de señalización en comparación con cantidades crecientes de sangre, que está sometida a tensión, proporciona información en cuando la capacidad innata de esa sangre para superar la tensión. Esta demostración de fuerza en la sangre de una persona, que está sometida a múltiples tensiones continuas, se denomina en el presente documento el "punto de inflexión" o "punto de retorno" de la

sangre.

Por consiguiente, el método y aparato desvelado mide la concentración de ROX y BOX en una muestra de sangre. En comparación con un compuesto patrón interno que representa sangre normal que tiene concentraciones normales de ROX y BOX, el presente método y aparato también puede medir la toxicidad de, y la respuesta fisiológica a, fármacos, productos químicos, y otras tensiones. También puede usarse como herramienta de investigación para aquellos que investigan biomarcadores, u otros fenómenos. Por ejemplo, los linfocitos T puede reclutar y usar ROX para ataque oxidativo, y las células normales pueden reclutar y usar ROX por requisitos de oxidación de glucosa. ROX es también útil para explicar y dar una indicación de la resistencia a la insulina de los diabéticos de Tipo II.

En el método desvelado, se extrae sangre de un paciente y se compara con la de un individuo sano. Las etapas del método incluyen introducir una cantidad de sangre recién extraída o congelada procedente de un individuo o paciente de análisis a un pocillo en un aparato de análisis que tiene un lector conectado a un sensor para detectar y medir ROX, BOX y SOX, así como otra información relacionada con estos acontecimientos. Un ejemplo de un aparato de análisis adecuado para esta medición es un Immunogram Analyzer™ (también denominado en el presente documento "IA"). Un Immunogram Analyzer™ genera un Immunogram™, que proporciona un resumen de datos de una serie de ensayo en el aparato. Un Immunogram™ puede usarse para identificar pacientes que no responden al tratamiento con fármacos de refuerzo o moduladores inmunitarios, tales como interferón.

Un Immunogram Analyzer™ está actualmente en ensayos clínicos. En particular, se están realizando ensayos clínicos con pacientes con hepatitis C y un grupo de control de pacientes sanos (University of Medicine & Dentistry of New Jersey IRB Protocol N.º 0120090320). El propósito del ensayo clínico es identificar pacientes que tienen un desequilibrio en la cantidad de niveles de ROX y BOX y examinar su evolución durante el ciclo de tratamiento con interferón y suplementos de ribavirina. Se prevé que la medición de los niveles de ROX y BOX tendrá implicaciones para el tratamiento de otras enfermedades crónicas, incluyendo diabetes y ciertos cánceres.

El sensor del aparato de análisis detecta la presencia de ROX y BOX en la muestra y genera una salida de concentraciones de ROX y BOX, incluyendo cambios de estas concentraciones, a lo largo del tiempo. Estas concentraciones de salida se comparan, seguidamente, con aquellas para un individuo sano.

El aparato de análisis también puede usarse durante exploraciones físicas normales como un indicador "inicial" de homeostasis y estado de salud. Por ejemplo, los efectos de ejercicio, meditación, fármacos, emocional y otras tensiones, etc., pueden monitorizarse para mejorar el estado del cuerpo o advertir de debilidades potenciales.

Se afirma además que hacer funcionar el aparato de análisis como un sistema cerrado con tensiones químicas u otras produce casos que duran hasta varias horas de SOX.

Con un sencillo análisis de sangre por el Immunogram™, se obtiene la información requerida para realizar una recomendación informada para tratamiento. En un análisis ejemplar, las etapas incluyen añadir una muestra de aproximadamente 0,05-0,5 ml de sangre del paciente a un pocillo o célula. Está contemplado por la presente divulgación que una célula adecuada puede ser cualquier estructura, incluyendo (pero no de acuerdo con la presente invención) la piel humana, lecturas observadas pueden leerse a través de la piel sin la necesidad de tomar una muestra de sangre. Los números de ROX y BOX pueden calcularse y emitirse por un lector/procesador calibrado a cero y el 100 % basándose en la saturación porcentual del O<sub>2</sub> equivalente. Fluctuaciones arriba y abajo, pendientes de velocidades de reacción, e intervalos de valores, son legibles y de valor potencial.

Un desequilibrio en las concentraciones de ROX y BOX indica un sistema inmunitario deprimido y uno que es menos sensible al tratamiento con fármacos de refuerzo o de modulación inmunitaria. En algunas enfermedades, sin embargo, ROX y BOX pueden elevarse temporalmente. La monitorización de los niveles de ROX y BOX para el mismo paciente durante un periodo de tiempo también puede ser de valor clínico y de diagnóstico. Por consiguiente, el método desvelado, que mide los niveles de ROX y BOX en sangre, puede ser una herramienta para monitorización del paciente, cribado de fármacos, evaluación de biomarcadores, así como otros fines relacionados.

Someter a la sangre a tensión, por sí misma, o mientras se mide ROX, BOX y SOX, y usar posteriormente esa sangre o sustancias procedentes de esa sangre, para efectuar una cura para el paciente, puede ser una aplicación de esta tecnología.

Usar este método para sintetizar características de ROX, BOX, SOX, y otros acontecimientos de ese tipo para los fines de administrar fármacos, terapia, curas o protocolos puede ser una aplicación añadida de esta tecnología.

En particular, la divulgación se describirá con referencia a la figura 1 donde un sistema biológico se representa esquemáticamente. En la figura 1, el sistema biológico, 100, incluye una matriz, 102, que es capaz de solvatar de forma reversible materiales de señalización, 108. Un material de transporte, 104, tal como un glóbulo blanco, extrae y/o empaqueta materiales de señalización, 108', en la matriz para transporte a o uso en abordar un componente indeseable, 106, tal como una infección, región cancerosa, etc., para desechado del mismo. Para los fines de la

divulgación, la cantidad disponible de materiales de señalización en la matriz, 102, se denomina ROX y la cantidad de materiales de señalización capaz de ser extraída por el material de empaquetamiento y/o transporte para consumo en el desechado de un componente indeseable es BOX. Tal como se constataría, se desea que tanto ROX como BOX estén dentro de un intervalo normal, y esto sugeriría una cantidad suficiente de materiales de señalización y una capacidad suficiente de utilización de los materiales de señalización.

La presente divulgación incluye además un aparato para medir ROX, BOX, SOX y otros componentes que son relevantes para el sistema inmunitario de un individuo u otras funciones corporales. En particular, la presente divulgación incluye un aparato de análisis capaz de realizar análisis, que son herramientas de investigación útiles más allá de las aplicaciones específicas descritas en el presente documento.

La presente divulgación también puede aplicarse al sistema nervioso, sistema de desintoxicación, sistema muscular o sistema de energía de una persona o cualquier fluido corporal que incluye capacidades de empaquetamiento tales como glóbulos blancos, para proporcionar información sobre la resistencia y eficacia de esos sistemas para superar una tensión, dependiendo de las circunstancias del individuo.

En un aspecto, el método desvelado incluye las etapas de medir las concentraciones de ROX y BOX en una muestra de sangre en comparación con una norma. Se cree que las concentraciones de ROX y BOX descubiertas en sangre son indicadores para medir la capacidad de un sistema inmunitario para suministrar oxígeno para defenderse contra patógenos, para señalar y coordinar la respuesta inmunitaria, y para mantener el nivel de homeostasis. El ROX y BOX de la sangre desempeñan un papel fundamental en el mecanismo usado por el cuerpo de un ser humano o animal para suministrar grandes cantidades de oxígeno a tejidos según se requiera, dependiendo de la tensión aplicada sobre el cuerpo.

Por lo tanto, la presente divulgación puede usarse para una serie de fines relacionados con la respuesta inmunitaria de seres humanos y animales a una tensión. Por ejemplo, un método de la divulgación puede usarse para evaluar el estado de salud de personas y animales generalmente, tal como durante una exploración física rutinaria, y para evaluar la disposición de pacientes que padecen cáncer, diabetes y síntesis de deficiencia autoinmunitaria (SIDA) a regímenes de inmunoterapia. El método desvelado puede usarse, además, para evaluar el rendimiento de atletas para mejorar su acondicionamiento, y para analizar personas expuestas a contaminación y otras tensiones externas. El método desvelado puede emplearse para estudiar enfermedades que actualmente no están bien definidas, tales como fibromialgia, enfermedades neuromusculares y neurodegenerativas.

El método desvelado puede usarse para cribar previamente más rápida y económicamente nuevos fármacos para toxicidad e inmunogenicidad, y para monitorizar individuos que participan en ensayos clínicos. Otros productos químicos, contaminantes medioambientales, o tensiones físicas tales como temperatura y presión, tensión emocional, y demás, también pueden, por lo tanto, analizarse.

Un facultativo o veterinario puede usar ROX y BOX como una medida de la homeostasis. A continuación, podría usar ROX y BOX para monitorizar un paciente que puede ser sensible a ciertos fármacos y/o protocolos médicos. Esto puede realizarse de al menos dos maneras: monitorizando al paciente extrayendo sangre para mediciones de ROX y BOX en tiempo real mientras el fármaco o el protocolo está siendo administrado, o midiendo el ROX y BOX de la muestra de sangre del paciente, que ha sido expuesto a un fármaco o protocolo, sin exponer realmente al paciente a un fármaco o protocolo potencialmente peligroso.

Otra característica de la presente divulgación incluye una medición directa de NO en el cuerpo. Antes de esta divulgación, una medición directa de NO no estaba disponible. Una demostración de cómo puede usarse esta divulgación en la prevención, pronóstico y cura del cáncer, y como una herramienta de investigación para clarificar preguntas fundamentales en la investigación del cáncer, se presenta en el presente documento.

Se ha descubierto que el óxido nítrico es muy crítico en la defensa contra el cáncer. Para que el cuerpo produzca óxido nítrico, se deben producir las siguientes etapas: 1) un gen debe codificar una enzima, la óxido nítrico sintasa (NOS); 2) este código debe ser expresado; 3) la enzima, NOS, debe fabricarse a partir del código de NOS; 4) la enzima debe tener todos los sustratos y cofactores que necesita para fabricar óxido nítrico; 5) la enzima debe activarse; y, relevante para este descubrimiento, 6) el NO debe empaquetarse en una forma que es fácilmente transportada a y enfocada en el sitio de uso.

El número de formas de genes codificados por NOS es de cientos. Estas formas se han caracterizado como: endotelial, eNOS; inducible, iNOS; neural, nNOS; y mitocondrial, mNOS. Esta divulgación desvela un nuevo tipo de NOS de sangre - bNOS.

Es el producto final, NO, el que es el más crítico. Por lo tanto, esta discusión usará el término simplificado, "NOS", para todas estas categorías.

En un artículo de revisión de la bibliografía titulado, An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer, Cancer Res. 15 de febrero de 2007, 67(4): 1407-10, L. Ying y L.J. Hofseth resumen que la

NOS modula todas las rutas críticas del cáncer incluyendo apoptosis, angiogénesis, ciclo celular, invasión y metástasis. Estos investigadores señalan que la NOS está desregulada en tumores sólidos humanos también, y que la NOS también presenta un papel en la inflamación crónica. Su recomendación es que la NOS se use como parámetro en la prevención y el tratamiento del cáncer.

En un estudio de secciones de tejido hepático humano de 100 pacientes por M A Rahman et al. Titulado , Co-expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C-virus positive cases Clin Cancer Res, mayo de 2001; 7(5): 1325-32, Rahman y colaboradores concluyen que aunque la expresión de la NOS en solitario no es un factor pronóstico de mortalidad en pacientes de cáncer hepatocelular (HCC) positivos para el virus de la hepatitis C (HCV), la combinación de la expresión de NOS y COX-2 se correlaciona con la mortalidad en pacientes de HCV/HCC.

Recientemente, S Fujita et al., en un artículo titulado Genetic polymorphisms in the endothelial nitric oxide gene correlate with overall survival in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy, BMC Medical Genetics 2010, 11: 167, señalan que existen más de 160 polimorfismos genéticos para NOS. Han descubierto un alelo especial del gen de NOS que es un marcador para la supervivencia en pacientes de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC). En un estudio de 108 pacientes con NSCLC y en tratamiento basado en platino, este gen de NOS es un marcador para la supervivencia.

Por un lado, los pacientes de HCV con HCC no sobreviven cuando se expresan los genes de NOS y COX-2. Por otro lado, los pacientes de NSCLC que expresan NOS sobreviven cuando se expresa un gen de NOS. ¿Cómo puede explicarse esta aparente incoherencia?

La expresión genética de NOS es un método de análisis complejo, costoso y que requiere tiempo. De forma más importante, la simple expresión del gen de NOS no es una determinación suficiente de que se ha formado, de hecho, NO. Esta divulgación proporciona una herramienta, el IA, que analiza fácilmente en busca de NO disponible. Adicionalmente, permite a los inventores postular un mecanismo que explica la aparente incoherencia. Por ejemplo, se puede predecir que los pacientes de NSCLC que sobreviven tienen el mecanismo ROXNO, mientras que los pacientes de HVC/HCC que no sobreviven no tienen ROXNO adecuado, y que COX-2 requiere oxígeno y, por lo tanto, es un lastre adicional para ROX.

La capacidad de formar modelos de enfermedad explicativos para análisis es crítica en la búsqueda de curas del cáncer. Tal como se usa en el presente documento, un modelo de enfermedad explicativo está formado por las siguientes etapas: 1) crear un modelo de enfermedad; 2) realizar un estudio clínico o de investigación para verificar el modelo; 3) si el modelo es correcto, expandirlo; y 4) si el modelo es incorrecto, modificarlo o mejorarlo de acuerdo con los datos.

Tal como se ilustra en la figura 2, un aspecto de la presente divulgación incluye el siguiente aparato y etapas del método. En primer lugar, se proporciona un aparato de análisis que tiene un pocillo o célula 10 para muestras con un sensor o sonda 20 y un lector/procesador 30. De forma significativa, la célula 10 puede ser cualquier tipo de estructura, incluyendo (pero no acuerdo con la invención) la piel humana. Las sondas resultantes se insertan en la célula y el aparato de análisis se calibra, de modo que la lectura para niveles de materiales de señalización esté en cero. Por ejemplo, un compuesto A, tal como solución salina libre de material de señalización puede añadirse a la célula E para obtener una lectura inicial del instrumento libre de material de señalización. Como alternativa, un gas que está libre de material de señalización puede burbujearse en la célula.

Una vez que se ha establecido un valor inicial que muestra una lectura nula para materiales de señalización, se añade una cantidad de sangre D a la célula E. Esta cantidad de sangre D puede ser una pequeña cantidad, tal como entre aproximadamente 0,02 ml y aproximadamente 0,10 ml, de sangre recién extraída o congelada de un individuo o paciente de análisis. Por comodidad, una muestra de 3,00 ml de sangre anticoagulada puede congelarse para análisis posterior. También pueden analizarse muestras muy pequeñas de sangre, tales como menos de aproximadamente 0,02 ml.

Se realiza una lectura inicial de los niveles de materiales de señalización en la muestra antes de que se imponga cualquier tensión. La mezcla de compuesto A y sangre D se expone a continuación a una tensión inicial B. Una tensión adecuada sería tensión cortante física producida por la jeringa de administración y/o un agitador magnético giratorio. El sensor dentro de la célula E determina a continuación una caída de la concentración de materiales de señalización, que es provocada presumiblemente por la adición de tensión B. Generalmente, esta caída de concentración de materiales de señalización produce el valor de BOX, que está correlacionado con la capacidad del sistema para incorporar materiales de señalización para transporte. Después de esta caída, cualquier aumento de la concentración de materiales de señalización produce el valor de ROX, que se correlaciona con la capacidad del sistema para proporcionar un reservorio de materiales de señalización.

El sensor del aparato de análisis de la presente invención incluye dos o más sensores - uno es un electrodo de oxígeno basado en membrana 22, tal como un electrodo de oxígeno Clark polarográfico, que mide O<sub>2</sub>, NO, H<sub>2</sub>S y

otros materiales de señalización que están no unidos y pueden, por lo tanto, penetrar a través de la membrana. En sensores polarográficos, un ánodo, que está polarizado, y un cátodo están sumergidos en un electrolito, en el que el oxígeno y otros materiales de señalización, penetran a través de la membrana. El par ánodo/cátodo hace que la corriente fluya en una proporción directa a la cantidad de material de señalización, tal como oxígeno, que entra en el sistema. La magnitud de la corriente se correlaciona, por lo tanto, directamente con la cantidad de material de señalización que entra en la sonda o el sensor. Sería evidente que un sensor basado en membrana necesariamente agota la muestra del material que está siendo analizado como resultado del consumo, aunque en el presente documento se considera que el nivel de material consumido por el sensor es de un orden de magnitud que es insignificante para fines prácticos.

El otro sensor 24 es un analizador de oxígeno disuelto por fluorescencia óptico, tal como una sonda de diodo emisor de luz (LED) de fibra óptica revestido de rutenio de Ocean Optics, y también puede incluir otros dispositivos basados en luz adecuados, que incluyen un láser (en lo sucesivo denominado como "sensor óptico"), que determina una cantidad de valor para  $O_2$  y el reservorio de  $O_2$  empaquetado (ROX $O_2$ ). Otros sensores, tales como sensores basados en un chip, también pueden usarse tomando como base precio, comodidad, y sensibilidad a nuevas sustancias de señalización y reactivas.

El aparato de análisis de la presente invención puede incluir un sistema computarizado, en el que líneas de datos procedentes de cada sonda están conectadas a un ordenador, que incluye un procesador, pantalla y software operativo para permitir el procesamiento y la organización de los datos obtenidos por las sondas, así como el cálculo de valores para acontecimientos relevantes, tales como un acontecimiento ROX, BOX o SOX.

Tal como se usa en el presente documento, "ROX $O_2$ " es el reservorio de  $O_2$  determinable, y "ROXNO" es el reservorio de NO determinable. Cuando están empaquetados por la sangre, y, en particular, los glóbulos blancos, que están preparando a los materiales de señalización para uso por el cuerpo, ROX $O_2$  y ROXNO son incapaces de desplazarse a través del sensor de membrana. Sin embargo, después de que se produce un acontecimiento BOX, niveles incrementados de materiales de señalización en la muestra, tal como se determina mediante el sensor de membrana u óptico, que tienden a rastrear entre sí, producen cantidades de ROX $O_2$  y ROXNO. Por ejemplo, si una lectura del sensor de membrana llega a cero, lo que significa que todo el  $O_2$  no unido se ha medido o ha penetrado a través de la membrana, un aumento posterior de la lectura del sensor óptico puede considerarse una determinación alternativa de la cantidad de ROX $O_2$ . Análogamente, una vez que una lectura de membrana para NO llega a cero, lo que significa que todo el NO no unido se ha medido o ha penetrado a través de la membrana, un aumento posterior de la lectura del sensor de membrana de este material de señalización produce una cantidad de ROXNO, suponiendo que cualquier oxígeno se represente por separado, tal como mediante un sensor óptico.

Entre estos dos o más sensores, por lo tanto, el análisis proporciona una lectura para  $O_2$ , NO, ROX $O_2$  y NO que está en un reservorio empaquetado (ROXNO), tal como se muestra en las figuras 6 y 7. Para este aspecto, una medición de ROX completa incluye ROX $O_2$  + ROXNO. Por lo tanto, las lecturas de la sonda de membrana y la sonda óptica juntas proporcionan una concentración total de BOX y ROX (ROX $O_2$  + ROXNO) en la muestra después de exposición a tensión física B. Además, las pendientes de las curvas en las figuras 6 y 7 producen información valiosa con respecto a las velocidades de reacción de estos componentes. Por ejemplo, un aumento de los niveles de materiales de señalización puede indicar un acontecimiento ROX y su temporización, mientras que una caída del nivel de materiales de señalización puede indicar un acontecimiento BOX y su temporización.

En resumen, cuando están siendo usados materiales de señalización en reacción a una tensión, se mostrará que los niveles de materiales de señalización caen. Sin embargo, una vez que se produce esta caída, cualesquiera aumentos posteriores de los niveles de materiales de señalización indican la presencia y las cantidades de materiales de señalización empaquetados, o reservorios de materiales de señalización, que previamente no se detectaron.

Tal como se ilustra adicionalmente en la figura 2, la mezcla de compuesto A y sangre D se expone a continuación a una tensión química C. La tensión C puede ser un producto químico potente tal como fenol acuoso al 6 % u otro tipo de tensión lo suficientemente fuerte para liberar esencialmente cualquier ROX restante en la muestra. El sensor dentro de la célula E mide a continuación cualquier aumento de oxígeno y NO, que es presumiblemente un resultado de la introducción de tensión C. Este aumento de oxígeno y NO después de que se aplica esta tensión produce la cantidad de ROX restante en la solución. Los niveles de materiales de señalización, tales como aquellos dentro de la muestra a lo largo del tiempo son rastreados y recuperados por el lector/procesador 30 del aparato de análisis.

De forma importante, el BOX y ROX de un fluido corporal parecen afectarse entre sí. Por ejemplo, si un fluido corporal tiene un ROX anormalmente bajo, el BOX para ese mismo fluido también tenderá a ser bajo, dado que hay menos material de señalización disponible para empaquetar. Análogamente, si el BOX de un fluido corporal es anormalmente bajo, ya que el fluido tiene menos capacidades de empaquetamiento, el ROX tenderá a ser bajo, dado que habrá menos material de señalización empaquetado. Además, la fuerza innata de un fluido corporal puede determinarse mediante los acontecimientos ROX y BOX detectables de ese fluido a lo largo del tiempo. En un fluido más fuerte de lo normal, la adición de más tensiones y/o tensiones más fuertes produciría un valor para BOX y/o ROX dentro de un intervalo normal, en comparación con un fluido más débil de lo normal, lo que produciría valores

para BOX y/o ROX fuera del intervalo normal, si se someten a las mismas tensiones.

Los cambios en las concentraciones de ROX y BOX pueden indicar si la respuesta de una persona a la tensión es aguda o crónica. Por ejemplo, un BOX sustancialmente debilitado puede ser un factor pronóstico de una respuesta aguda frente a crónica. Si el BOX de un paciente es anormalmente bajo después de un acontecimiento que produce tensión, la respuesta del paciente podría ser una respuesta crónica, mientras que si el nivel de BOX es normal y más elevado después de la tensión, esto podría ser una indicación de una respuesta aguda.

La presente divulgación incluye además un método para medir la toxicidad de un fármaco dado u otra tensión. Este método es diferente del método en la figura 2, dado que un patrón interno (o la sangre del paciente), junto con un fármaco o toxina dada, puede usarse para determinar la toxicidad de ese fármaco con respecto a un patrón, o la sensibilidad del paciente individual a ese fármaco o toxina. Tal como se muestra en la figura 3, se proporciona el aparato de análisis que tiene un pocillo o célula de análisis 10 con un sensor 20 y un lector/procesador 30. Un compuesto A se introduce en una célula E del aparato de análisis. El compuesto D, que es una muestra de sangre sustituta tal como sangre bovina anticoagulada, se añade a continuación a la célula E. La mezcla de compuesto A y compuesto D se expone a continuación a una primera tensión química B. El sensor de la célula E mide cualquier caída de los materiales de señalización, lo que genera la cantidad de BOX en la muestra. A continuación, una segunda tensión química C se añade a la mezcla en la célula E. El aumento medido de materiales de señalización, según lo detectado por el sensor, da la cantidad de ROX en la muestra. Por lo tanto, la toxicidad de un fármaco dado puede analizarse, para cribado de fármacos generales, o para monitorizar la toxicidad del fármaco para un paciente dado.

La presente divulgación incluye además un método para obtener un acontecimiento SOX y para medir el ROX y BOX de un paciente que se está sometiendo a dicho acontecimiento. Tal como se ilustra en la figura 4, un compuesto A se añade a una célula E que tiene un sensor o sensores. Una muestra de sangre S se añade a la célula. Se añade una tensión física o química B. La caída de los materiales de señalización medida por la célula da BOX. Una tensión física o química C y otras pueden añadirse para reforzar el "disparo" de la respuesta inmunitaria, y la célula se cierra al entorno externo. Un acontecimiento SOX tiene lugar a lo largo del tiempo y se registra. SOX representa un "disparo" real de las células sanguíneas. Por lo tanto, la mezcla que contiene este material puede ser de la máxima utilidad, por ejemplo en terapia y/o cura del cáncer y el SIDA, cuando es devuelta al paciente.

Para tener valor clínico y de diagnóstico, las lecturas de concentración de ROX y BOX se comparan con las de individuos sanos, o con el mismo individuo durante un estado de salud normal. Generalmente, si las concentraciones de ROX y BOX para el individuo o paciente de análisis están fuera de un intervalo normal en comparación con las concentraciones para los del individuo sano (o del mismo paciente, durante un periodo saludable), el individuo o paciente de análisis tiene un desequilibrio y, por lo tanto, una capacidad probablemente menor de responder al ataque por una enfermedad o una respuesta reducida a inmunomoduladores que la persona media. Si las concentraciones de ROX o BOX del individuo o paciente de análisis están dentro del intervalo normal de concentraciones en comparación con los del individuo sano, se esperaría que el individuo de análisis respondiera normalmente a enfermedad y el paciente debe responder bien a la inmunomodulación.

Tal como se apreciará en este contexto, el sensor basado en membrana y el sensor óptico, si se emplean, proporcionan ambos una medición que se correlaciona con el oxígeno molecular, sin embargo, el sensor basado en membrana detecta otros materiales, tales como NO. En un aspecto preferido, la correlación de las mediciones proporciona una herramienta analítica que permite la determinación indirecta de componentes adicionales, ampliando de este modo enormemente la información de diagnóstico y biológica.

Un Immunogram™ esquemático se proporciona en la figura 5. En el inmunograma, los resultados de la medición óptica se indican en función del tiempo (T) mediante la línea continua y los resultados del sensor basado en membrana se indican mediante la línea discontinua. Una señal que se mueve hacia arriba indica un incremento de materiales medidos y una señal que se mueve hacia abajo indica una disminución del material medido.

Con referencia a la figura 5, se establece un valor inicial, 200, que es representativo de la cantidad total de materiales de señalización medida en la matriz. Las dos señales son normalmente similares con la excepción de un nivel elevado de NO u otros materiales que son medidos por el sensor basado en membrana. A un tiempo específico, T1, se aplica una tensión al sistema, con lo que materiales de señalización son extraídos de la matriz por los glóbulos blancos, por ejemplo, para transporte. La disminución del material de señalización medido, 202, se correlaciona con el material de señalización retirado de la matriz para transporte que se denomina en el presente documento BOX. A tiempo, T2, se incrementa la tensión, y esta tensión adicional causa la liberación de materiales de señalización a la matriz. La cantidad total de materiales de señalización, 204, es ROX. La cantidad de oxígeno, según lo medido por el sensor óptico, 206, permite una determinación de los materiales de señalización que no son oxígeno, tales como óxido nitroso por la diferencia entre el material de señalización medido por el sensor basado en membrana, 208, y el medido por el sensor óptico, 206, que se denomina ROXNO, 212. En particular, después de que se forme ROX, y ROX sea mayor según lo determinado por el sensor de membrana que por el sensor óptico, la diferencia es la cantidad de NO. ROXO<sub>2</sub>, indicado por 210, es la suma total de ROX menor ROXNO, indicado por 212.

Un ejemplo de datos generados a partir de un aparato de análisis de la presente invención se muestra en la figura 6. Se muestran seis series en esta figura. Comenzando desde la izquierda del diagrama, las primera y tercera series son repeticiones con solución salina. La segunda serie es una calibración a cero donde se usa burbujeo de helio (o cualquier otro procedimiento) para marcar un punto 'cero', con equilibrado al 20,9 % de oxígeno atmosférico usado para determinar el valor inicial. Las dos series siguientes son inyecciones repetidas con una mezcla de solución salina/borato, que demuestran los incrementos de BOX y ROX en presencia de borato, tal como se usa normalmente en lociones oculares. La serie final demuestra el efecto de aspirina, indicando liberación muy rápida de NO tal como se esperaba a partir de las propiedades vasodilatadoras y anticoagulantes de la aspirina. La serie también demuestra una nueva ruta para el mecanismo de actividad de la aspirina en la sangre: esta ruta afecta a la sangre directa e instantáneamente. La nueva ruta también podría ayudar a descubrir la ruta y el efecto de otros fármacos.

Tal como se muestra adicionalmente, la salida de un sensor de tipo Clark con una membrana, que mide el O<sub>2</sub> y el NO, se representa mediante guiones cortos con cuadrados abiertos. El sensor óptico (mostrado mediante una línea continua con rombos) mide solamente el O<sub>2</sub>. La diferencia entre los dos sensores (guiones grandes con círculo abiertos) se muestra por conveniencia. La caída en ambos sensores se debe a la adición de sangre. La caída en la línea del sensor de membrana se define como BOX, y se indica mediante la flecha más pequeña en la figura 6. La curva del sensor óptico no cae tanto como el sensor de membrana. La diferencia, círculos abiertos, representa el oxígeno que no puede atravesar la membrana pero puede ser leído ópticamente. Esto es ROXO<sub>2</sub>. El punto en el que la tensión C se añade representa un gran incremento en las lecturas. La flecha más grande en la figura 6 indica el aumento, que se define como ROX. Nótese que la lectura de la membrana es mayor que la lectura óptica. Esto significa que NO (y posiblemente otros compuestos tales como H<sub>2</sub>S) acaban de ser liberados. Esto se debe a la rotura de ROXNO más cualquier NO recién fabricado. La presente divulgación proporciona el único método conocido para determinar directamente el NO presente en un fluido o material. Además, si el material que está siendo analizado muestra inicialmente una concentración nula para NO, y seguidamente se detecta NO, el descubrimiento de bNOS se muestra además en dicha serie de análisis. Otros sensores, con o sin membranas también pueden usarse, individualmente o en combinación.

La tabla I, tal como se muestra a continuación, resume los datos de la figura 6 y demuestra el uso de la presente divulgación para determinar la toxicidad y otros efectos de productos farmacéuticos sobre la sangre. Tanto la loción ocular con borato como la aspirina afectan a ROX y BOX, en comparación con series de solución salina en la sangre de un paciente. El efecto de la aspirina sobre el mismo paciente indica resultados de anticoagulación para este paciente. El rápido aumento de la formación de NO a partir de ROXNO y la síntesis de NO resultante, no mostrada en la tabla, es valioso, por ejemplo, en el análisis de aspirina en sangre. En la figura 6, se forma una gran cantidad de NO en el intervalo entre los marcadores, separados por 2 segundos.

<b>Tabla I</b> Resumen de la figura 6, que demuestra el uso del aparato. Efecto del borato y la aspirina sobre sangre humana envejecida durante 5 días a temperatura ambiente. 0,10 ml de sangre, 0,9 ml de solución salina. Los números están en porcentaje de saturación de aire. Los comentarios están sujetos a la interpretación del investigador.				
	1 promedio de solución salina de 2 series	2 promedio de borato de 2 series	3 Aspirina	Comentarios
BOX	27	41	35	La aspirina y el borato incrementan ROX y BOX, con el borato teniendo una influencia más fuerte que la aspirina. La aspirina produce más ROXO <sub>2</sub> y ROXNO. La aspirina induce un aumento medible y rápido de NO, un aumento del 37 % en 2 segundos (figura 4)
ROX	57	79	74	
ROXO <sub>2</sub>	20	27	29	
ROXNO	23	31	34	
Notas	base	El borato es un refuerzo a concentraciones médicas	La aspirina refuerza ROXO <sub>2</sub> y ROXNO	

Una gran cantidad de información adicional puede deducirse a partir de un análisis típico ejecutado por el aparato de análisis: el BOX, indicado por una caída de los materiales de señalización detectados, puede producir una pendiente y la concentración en varios puntos, a partir de la cual la cinética de Michaelis-Menten (curva de oxígeno en función de la velocidad de reacción), y técnicas más sofisticadas para analizar la cinética de reacción, pueden derivarse. El lento aumento que sigue, da las velocidades de aumento de oxígeno y NO, la parte de ROX da las velocidades de suministro de NO y O<sub>2</sub>. Además, se entiende que la hemoglobina está presente en una muestra de sangre, la curva de BOX a nivel de saturación del 50 % ya que la muestra debe estar mostrando una disminución sustancial de la

pendiente debido a la velocidad de consumo de O<sub>2</sub>. Las pendientes de BOX muestran que el mecanismo para el consumo de sangre y O<sub>2</sub> está más allá de la simple difusión de O<sub>2</sub> desde la hemoglobina. También están actuando fuerzas electromagnéticas. En particular, los glóbulos blancos también están capturando o usando materiales de señalización, que son presumiblemente de naturaleza paramagnética cuando están en forma empaquetada, a través del uso de fuerzas electromagnéticas. Dado que por debajo del 50 % de saturación, la hemoglobina comienza a liberar O<sub>2</sub> adicional en la solución. Si el consumo de O<sub>2</sub> fuera constante, la pendiente parecería más superficial debido a que se añadiría nuevo oxígeno.

La figura 7 es un gráfico que muestra 12 series con el aparato de análisis. Estas series se realizaron para analizar la reproducibilidad del aparato, el procesamiento del patrón sustituto de sangre, y la habilidad del operador para medir patrones sanguíneos. Comenzando desde la izquierda, las 3 primeras series fueron realizadas por el experimentador 1. El resto de las series fueron realizadas por el experimentador 2. También se analizaron concentraciones anticoagulantes de ACD. Los resultados muestran que congelar los patrones sanguíneos reduce BOX y ROX ligeramente, y las mayores concentraciones de ACD, combinadas con congelación, reducen ROX y BOX al máximo, indicando tratamiento severo de la sangre patrón.

Los resultados del análisis de la figura 7 se resumen a continuación en la tabla II. Estas sucesiones de series demuestran cómo determinar las concentraciones y condiciones operativas óptimas del aparato de análisis, y cómo usar el aparato para formar a operadores del aparato.

**Tabla II** Resumen de la figura 7, que demuestra el uso del aparato. Efecto de congelación y concentraciones elevadas de ACD anticoagulante sobre patrón sanguíneo bovino. 0,05 ml de sangre, 0,3 ml de solución salina. Los números son en porcentaje de saturación de aire. Los comentarios están sujetos a la interpretación del investigador.

	1 Promedio de 5 series 1,2 x ACD fresco	2 Promedio 3 series 1,2 x ACD congelado	3 Promedio de 2 series 2,2 x ACD fresco	Promedio de 3 series 2,2 x ACD congelado	Comentarios
BOX	78	79	80	74	La tensión destaca con 2,2 ACD congelado.
ROX	118	113	108	99	
ROXO <sub>2</sub>	31	30	33	34	
ROXNO	26	25	20	21	
Notas	Congelar 1,2 x ACD rebaja ROX en un 4 %		Congelar 2,2 ACD rebaja BOX en un 8 % rebaja ROX en un 9 % incrementa ROXO <sub>2</sub> en un 10 % rebaja ROXNO en un 25 %		Las células sanguíneas fabrican más ROXO <sub>2</sub> en previsión de toxicidad química. La toxicidad previene la generación de ROXNO.

Preferentemente para un estudio clínico, las concentraciones de ROX y BOX normales con las que comparar muestras de análisis se obtendrán tomando muestras de una gran población de individuos que no estén tomando medicamentos prescritos y que se describen a sí mismos como no enfermos. Una distribución de concentraciones de ROX y BOX se generará a partir de esta población. La media definirá un valor inicial ajustado a un número estándar tal como 100.

Las tablas III y IV a continuación muestran datos recogidos a partir de una clínica privada relacionados con la respuesta en muestras de sangre de individuos "normales" (individuos que estaban libres de enfermedad en el momento del análisis) en comparación con individuos infectados con hepatitis C. Tal como se ilustra en la tabla III, se estableció un patrón de tensión media, y se realizaron una sucesión de series para medir los niveles de oxígeno en las muestras mediante un sensor de membrana y un sensor óptico. Basándose en estas mediciones, el sensor de membrana detectó un porcentaje de más de aproximadamente el 20 % de oxígeno, y el sensor óptico detectó un porcentaje de más de aproximadamente el 11,5 % de oxígeno en sangre que estaba en un estado sometido a tensión.

**TABLA III: Clínica privada - respuesta a tensión media**

SERIE	DESCRIPCIÓN	MEMBRANA O <sub>2</sub> + NO, %	ÓPTICO O <sub>2</sub> + ROXO <sub>2</sub> , %
1	Patrón de tensión MedX	34	7,8
2	HepC	26,4	12,4
3	Normal	13,1	11,1
4	HepC	23,6	15,6
5	Normal	19,1	9,4
6	Normal	15,2	4,6

SERIE	DESCRIPCIÓN	MEMBRANA O <sub>2</sub> + NO, %	ÓPTICO O <sub>2</sub> + ROXO <sub>2</sub> , %
<b>Tensión media "Normal"</b>			
<b>M&lt;20 L&lt;11,5</b>			

La tabla IV muestra el ROX, BOX y el nivel de NO detectados en las muestras de sangre de los mismos individuos. Basándose en las mediciones de ROX, BOX y NO, la sangre normal mostraba un ROX entre aproximadamente 40 y aproximadamente 110, un BOX entre aproximadamente 40 y aproximadamente 160, y NO de menos de aproximadamente 200. El propósito de esta tabla es mostrar el método de determinación del intervalo de valores de ROX y BOX normales para fines de identificar un desequilibrio con respecto a BOX y ROX. Los números reales obtenidos no son tan importantes como el hecho de que se determinó que un intervalo de BOX y ROX era normal dentro de este muestreo de individuos. En el caso de pacientes de HepC, por ejemplo, el intervalo de normalidad puede ajustarse posteriormente a medida que se obtienen más datos clínicos.

**TABLA IV: Clínica privada - ROX, BOX, NO**

SERIE	DESCRIPCIÓN	ROX	BOX	NO
1	Patrón de tensión MedX	82,7	200	206
2	HepC	110,6	187	237
3	Normal	108,3	155	162
4	HepC	113,9	173	205
5	Normal	101,1	101	93
6	Normal	91,1	44	45
<b>ROX "Normal": 40&lt;ROX&lt;110</b>				
<b>BOX "Normal": 40&lt;BOX&lt;160</b>				
<b>NO "Normal": NO&lt;200</b>				

La tabla V a continuación proporciona información relativa al punto de inflexión sanguíneo en relación con la presente divulgación. Se realizan análisis con incrementos graduales de toxina, en niveles crecientes de sangre. Después de la lectura de BOX a tensión 1, se añade la tensión química por partes, en lugar de añadirla de una vez. Normalmente, una cantidad de toxina, tal como 0,2 ml de fenol al 6 % se añade secuencialmente tres veces, para la Tensión 2, 3 y 4. A niveles bajos de sangre, ROX comienza a formarse, y los niveles de O<sub>2</sub> y NO aumentan. La sangre es superada por la toxina y se liberan O<sub>2</sub> y NO.

A niveles elevados de sangre, la sangre es suficientemente fuerte para superar la tensión 2, los niveles de O<sub>2</sub> y NO no aumentan, en su lugar, se consume más oxígeno. Este nivel es un punto de inflexión, lo que significa que la sangre supera esa tensión.

Para la sonda óptica anterior, el punto de inflexión comienza a 0,10 ml de sangre. Para la sonda de membrana, el punto de inflexión comienza a 0,20 ml de sangre. Una persona con una sangre más fuerte requeriría menos sangre para alcanzar el punto de inflexión. De esta manera, puede monitorizarse un perfil de fuerza del sistema inmunitario para cada individuo. Cada individuo puede optimizar de este modo su estado de salud observando dos perfiles separados (perfiles óptico y de membrana) en función de los hábitos, el ejercicio, la exposición a fármacos y toxinas, etc.

<b>Nivel de tensión</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Bajo = 1</b>					
<b>Alto = 4</b>					
Punto de inflexión de la sonda óptica	0,02 ml de sangre	Débil	Débil	Débil	Débil
	0,05 ml de sangre	Débil	Débil	Débil	Débil
	0,10 ml de sangre	Débil	Débil	Fuerte	Fuerte
	0,20 ml de sangre	Débil	Débil	Fuerte	Fuerte
Punto de inflexión de la sonda de membrana	0,02 ml de sangre	Débil	Débil	Débil	Débil
	0,05 ml de sangre	Débil	Débil	Débil	Débil
	0,10 ml de sangre	Débil	Débil	Débil	Fuerte
	0,20 ml de sangre	Débil	Débil	Fuerte	Fuerte

**TABLA V Determinación de la fuerza del sistema inmunitario.**

La figura 8 es un gráfico que muestra dos análisis. El resultado de estos análisis se detalla en la tabla VI. Los números presentados son en saturación porcentual (100 % = cantidad de oxígeno equivalente en agua, equilibrada con aire a presión atmosférica y 25 °C). Se muestran series para 0,20 y 0,05 ml de sangre en la figura 8. Las tasas de BOX máximas son para tensión cortante solamente. La formación de NO es después de que se añada tensión química y las series se completan.

Estos datos pueden usarse de muchas maneras para evaluar la fuerza global del sistema inmunitario. Por ejemplo, los perfiles de tasa de BOX máxima para ambas sondas pueden observarse para un paciente con un medicamento dado, y compararse con una serie previa sin el medicamento, para evaluar la respuesta del paciente al fármaco. Esto también puede realizarse para evaluar la respuesta del atleta a un régimen de entrenamiento, etc.

El punto 'de retorno' puede localizarse a partir de las series y usarse para calibrar la fuerza inmunitaria general de un sujeto, en gran medida como una valoración cuantitativa de sangre, tal como se muestra en la figura 8.

La concentración final de NO, y la generación global de NO, indican aspectos muy importantes de la anticoagulación para pacientes cardíacos, la disponibilidad de NO y la dosificación de ROXNO para pacientes de degeneración neuromuscular, especialmente pacientes de distrofia muscular de Duchenne, que se sabe que tienen un desequilibrio de NO.

	Tasa máxima de BOX total / por ml de sangre sonda óptica	Tasa máxima de BOX total / por ml de sangre sonda de membrana	Formación de NO total / por ml de sangre
0,02 ml de sangre	8,47 / 423,5	4,24 / 212	39,33 / 1,966,5
0,05 ml de sangre	32,98 / 659,6	7,87 / 157,4	39,33/786,6
0,10 ml de sangre	37,52 / 375,2	9,08 / 90,8	35,55 / 355,5
0,20 ml de sangre	42,36 / 211,8	17,4 / 87	29,95/149,75

**TABLA VI Determinación de la fuerza del sistema inmunitario mediante medición de la tasa máxima de BOX, y el NO total formado.**

Está contemplado además por la presente divulgación que la determinación de ROX y BOX puede utilizarse en numerosas aplicaciones a partir de potenciar la capacidad de un organismo vivo para combatir la enfermedad, aceptar una terapia, incluyendo un trasplante de órgano, y mejorar la salud en general.

Por lo tanto, la presente divulgación incluye, además, un método para controlar las concentraciones de ROX y BOX, que comprende las etapas de: 1) proporcionar un sensor; 2) proporcionar una muestra u organismo que incluye una cantidad de material corporal con una cantidad de material de señalización; 3) determinar un valor inicial mediante el sensor para la cantidad de material de señalización; 4) introducir una tensión en la muestra u organismo; 5) determinar, mediante el sensor, un valor para ROX en la muestra u organismo; 6) determinar, mediante el sensor, un valor para BOX en la muestra u organismo; e introducir un material de control o de bloqueo en la muestra u organismo, donde el material de control es capaz de alterar el valor para ROX o BOX en la muestra u organismo. Basándose en este método, un material de control o de bloqueo exitoso puede identificarse y administrarse a un organismo vivo en una cantidad eficaz para ajustar cualquier desequilibrio de ROX y BOX, para crear un acontecimiento SOX, o preparar al organismo para una tensión inminente.

La presente divulgación incluye además un método para predecir la aparición de rechazo a un trasplante de órgano o a un fármaco, que comprende las etapas de: 1) proporcionar un sensor; 2) proporcionar una muestra a partir de un paciente que se pretende que se someta a tratamiento, que incluye una cantidad de material corporal con una cantidad de material de señalización; 3) determinar, mediante el sensor, un valor inicial para la cantidad de material de señalización; 4) introducir una tensión en la muestra, donde la tensión incluye una cantidad de material de tratamiento, y donde el material de tratamiento es un material que es fundamental para el tratamiento, concretamente un trasplante de órgano; 5) determinar, mediante el sensor, un valor para ROX en la muestra; y 6) determinar, mediante el sensor, un valor para BOX en dicha muestra. Basándose en los valores de ROX y BOX para el paciente sometido a un muestreo del tratamiento inminente, puede determinarse la capacidad de un paciente para aceptar un nuevo órgano o el rechazo de un trasplante existente.

**REIVINDICACIONES**

1. Un aparato para medir ROX, BOX, ROXO<sub>2</sub> y ROXNO en una muestra de sangre, comprendiendo el aparato:
- 5 una sonda óptica que determina cantidades para O<sub>2</sub> y ROXO<sub>2</sub> y un electrodo de oxígeno basado en membrana que mide O<sub>2</sub>, NO, H<sub>2</sub>S y otros materiales de señalización que están no unidos y pueden, por lo tanto, penetrar a través de la membrana,
- 10 donde dicho electrodo de oxígeno basado en membrana y dicha sonda óptica están conectados de forma operativa a un procesador para calcular, a lo largo del tiempo,
- un valor para BOX, que es una medición de una disminución de las cantidades de O<sub>2</sub>, NO, H<sub>2</sub>S y otros materiales de señalización que están no unidos y pueden, por lo tanto, penetrar a través de la membrana, en dicha muestra después de la introducción de una primera tensión,
- 15 un valor para ROX, que es una medición de un incremento de dichas cantidades de O<sub>2</sub>, NO, H<sub>2</sub>S y otros materiales de señalización que están no unidos y pueden, por lo tanto, penetrar a través de la membrana, después de la introducción de una segunda tensión, incrementada,
- un valor para ROXNO, que se calcula determinando una diferencia entre un incremento de dicha cantidad de O<sub>2</sub> medida por dicha sonda óptica y dicho incremento de dichas cantidades de O<sub>2</sub>, NO, H<sub>2</sub>S y otros materiales de señalización que están no unidos y pueden, por lo tanto, penetrar a través de la membrana, medidas por dicho electrodo de oxígeno basado en membrana, y
- 20 un valor para ROXO<sub>2</sub>, que es ROX menos ROXNO.
2. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho electrodo de oxígeno basado en membrana es un electrodo de oxígeno polarográfico.
- 25 3. El aparato de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha sonda óptica es una sonda con diodo emisor de luz de fibra óptica revestida de rutenio.

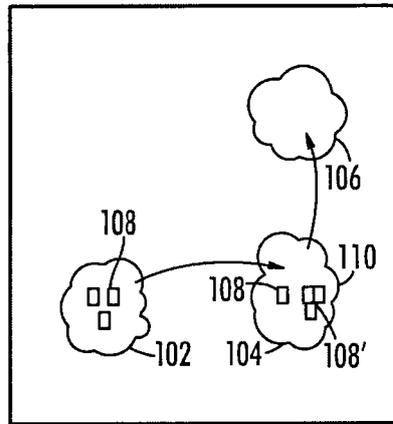
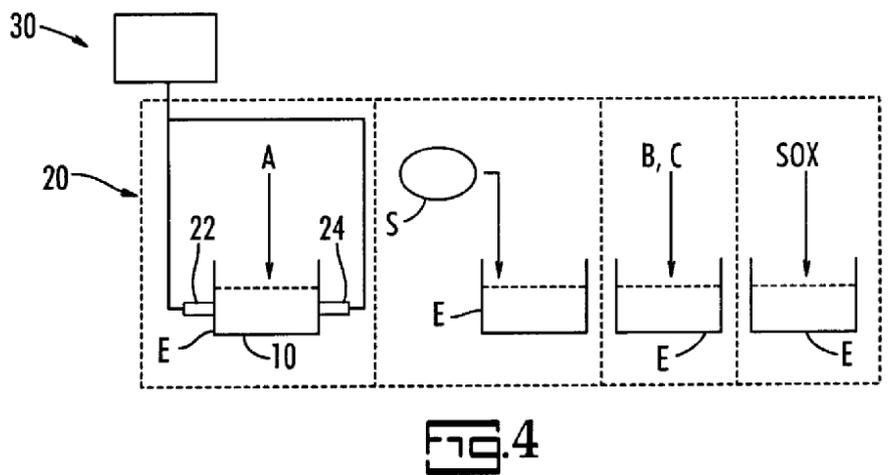
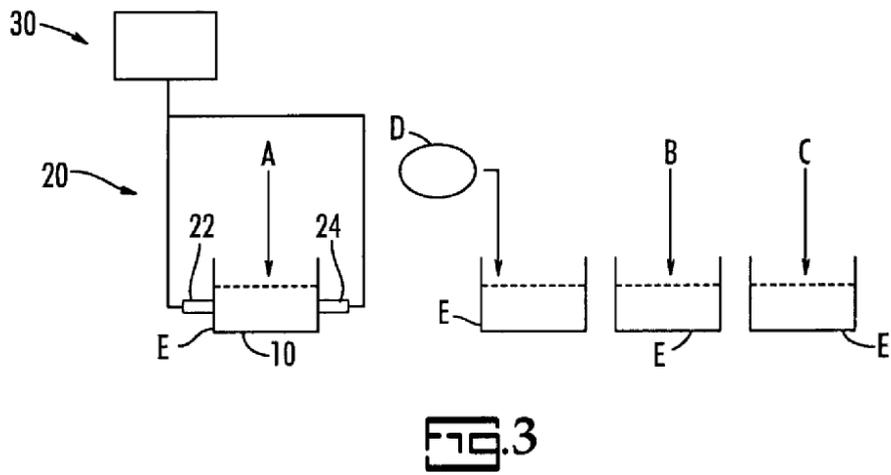
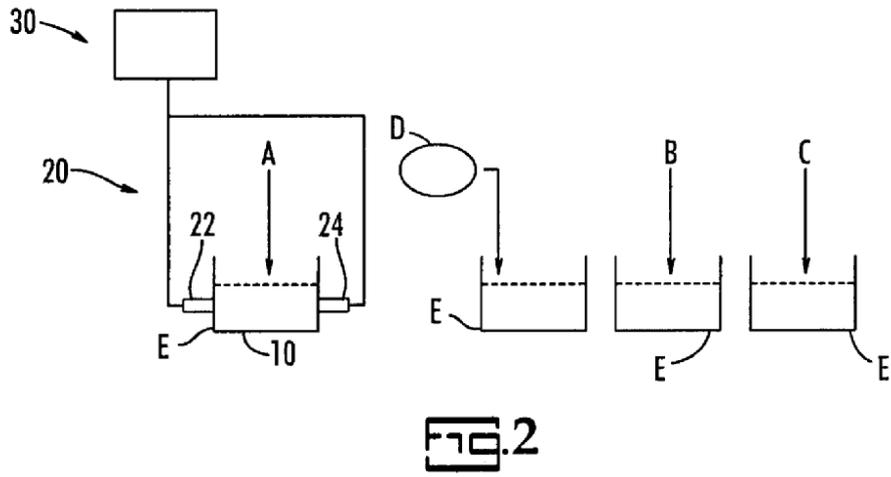


FIG. 1



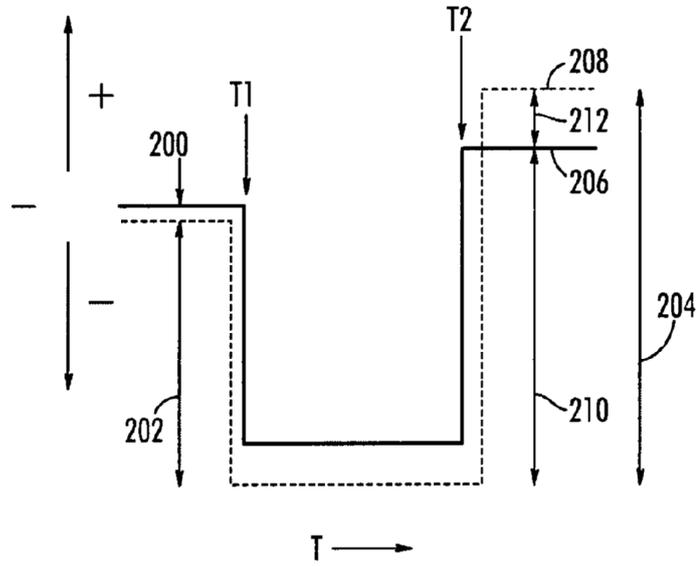
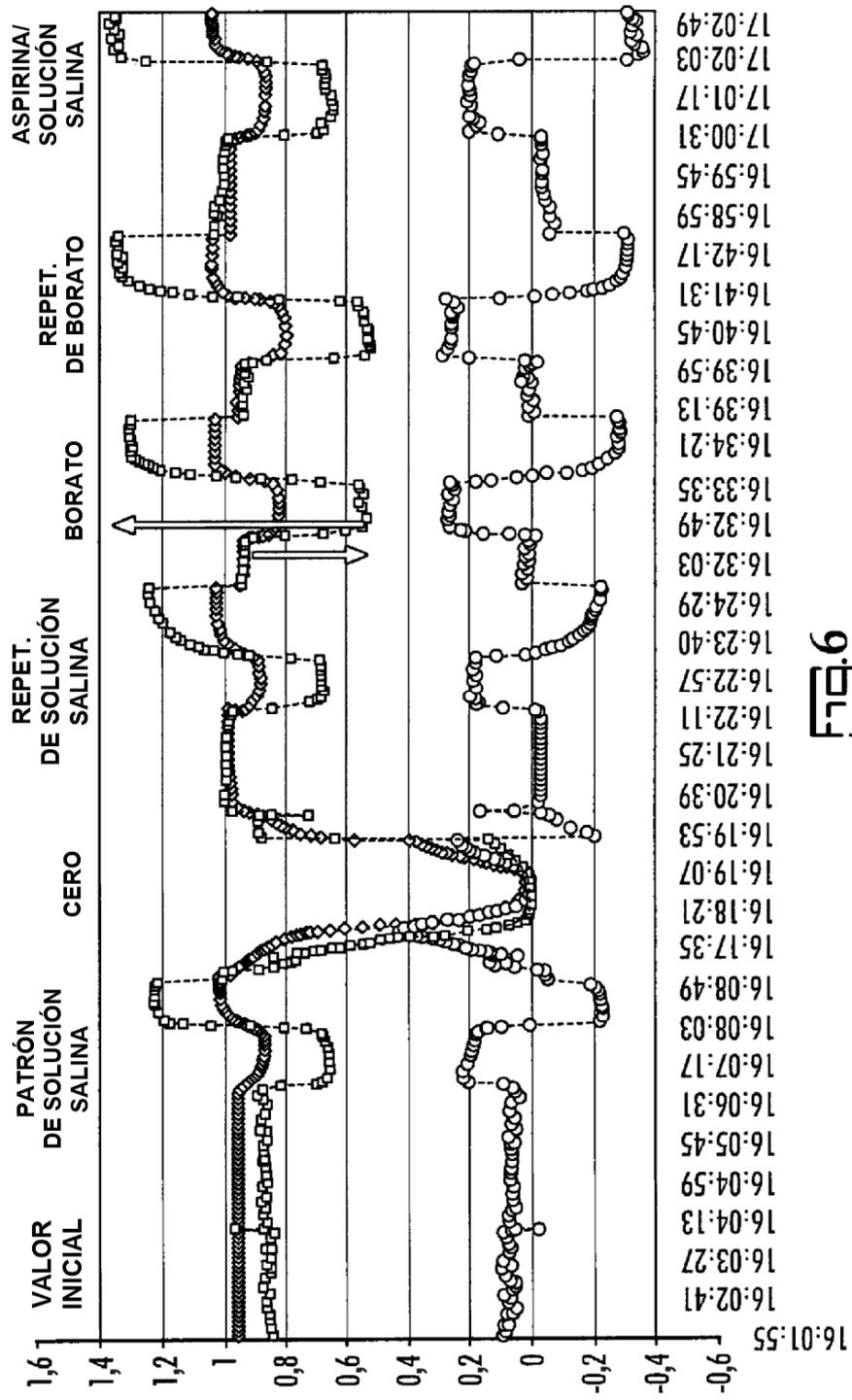
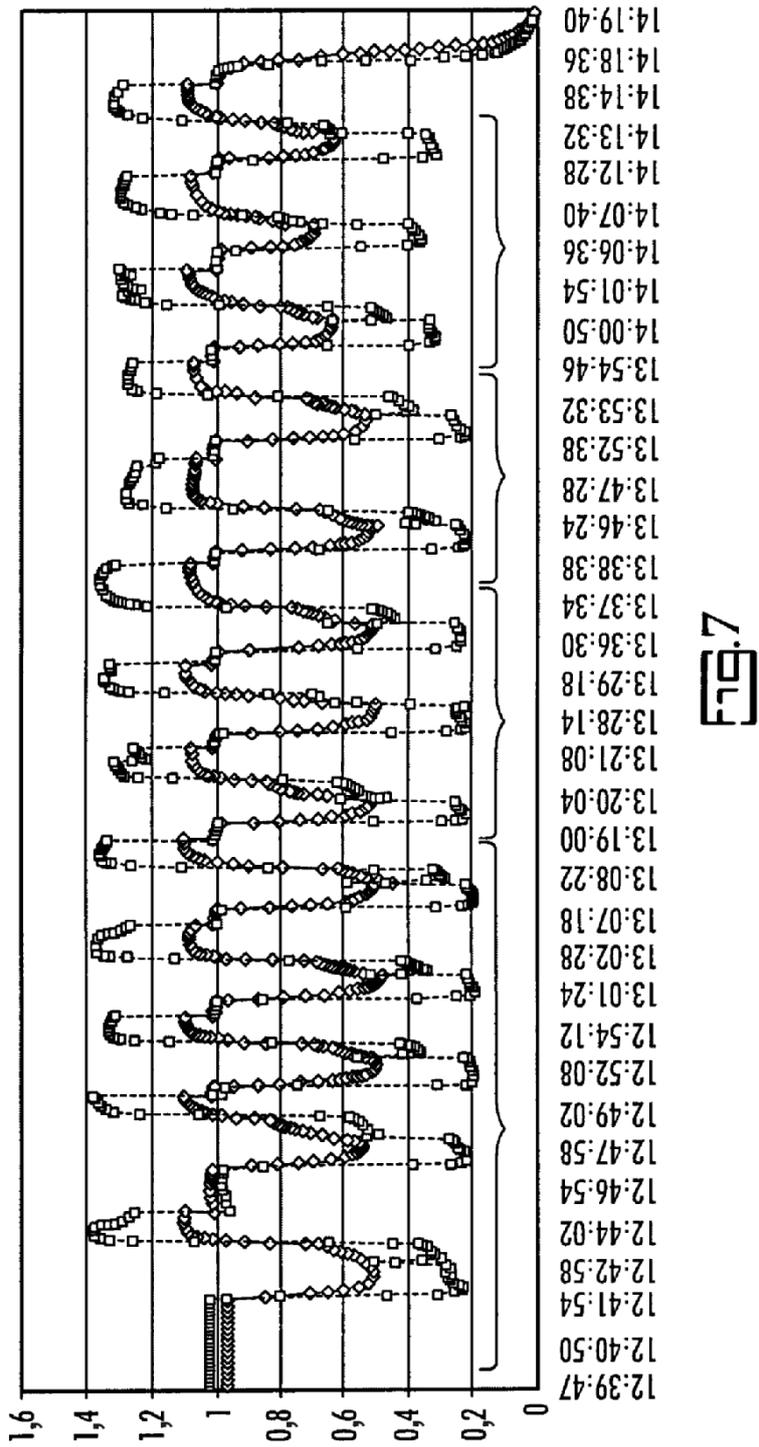


FIG. 5



9.6



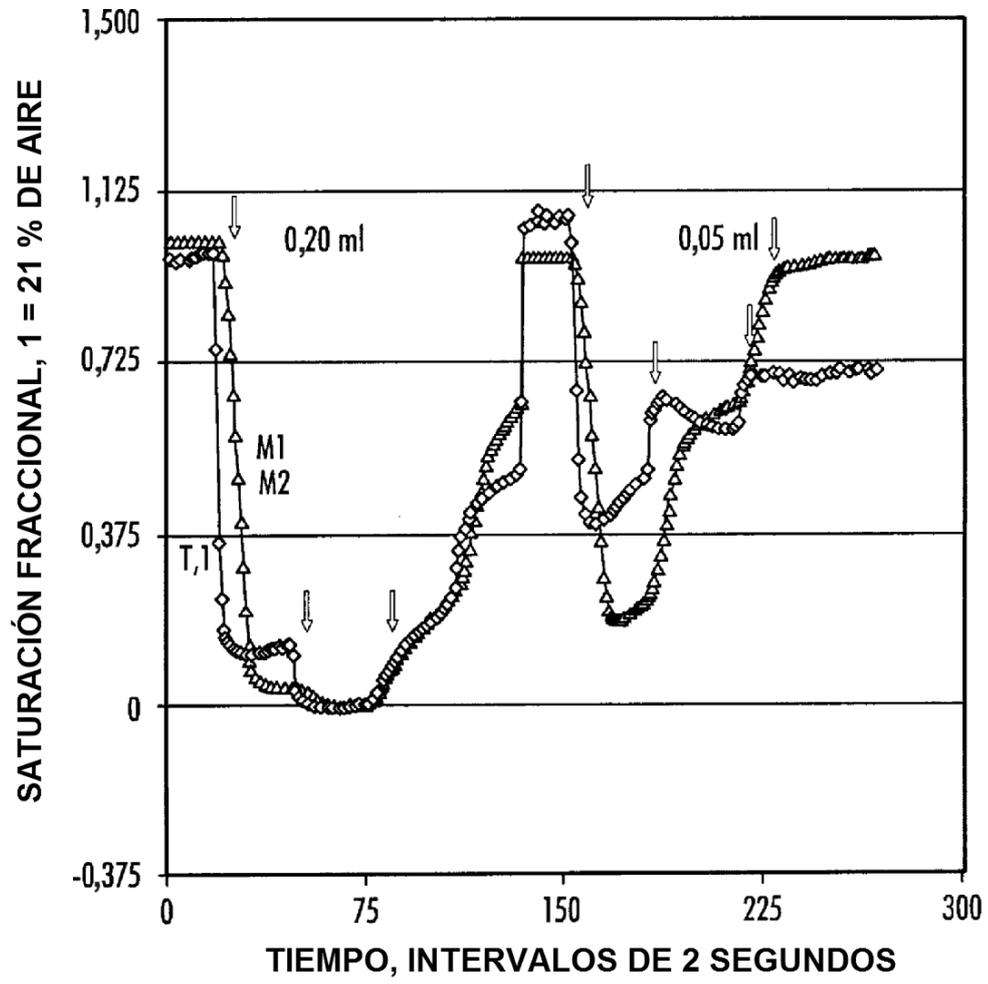


FIG. 8