

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 039**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2011 PCT/DE2011/075225**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012 WO12037937**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2011 E 11808564 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2616816**

54 Título: **Procedimiento para la detección, la diferenciación y la cuantificación de poblaciones de células T por medio de la tecnología de PCR en tiempo real cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR)**

30 Prioridad:

**17.09.2010 DE 102010037622**

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

**22.05.2017**

73 Titular/es:

**LOPHIUS BIOSCIENCES GMBH (100.0%)  
Am BioPark 13  
93053 Regensburg, DE**

72 Inventor/es:

**DEML, LUDWIG;  
NAUMANN, KRISTINA;  
SCHLOMBS, KORNELIA y  
BARABAS, SASCHA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 613 039 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección, la diferenciación y la cuantificación de poblaciones de células T por medio de la tecnología de PCR en tiempo real cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR)

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección, la diferenciación y la cuantificación de poblaciones de células T, que comprende las siguientes etapas a) poner en contacto una primera alícuota de un fluido corporal de un individuo con al menos un antígeno, conteniendo el fluido corporal células presentadoras de antígenos (CPA) y células T, b) incubar la primera alícuota con el al menos un antígeno a lo largo de un periodo de tiempo determinado, c) detectar y diferenciar las poblaciones de células T mediante detección de al menos un primer marcador de las CPA inducido por las células T de una población de células T determinada en la primera alícuota y en una segunda alícuota del fluido corporal del individuo, que no se incubó con el al menos un antígeno, mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR), y d) detectar y cuantificar las poblaciones de células T determinando la relación del marcador detectado de las CPA de la primera alícuota con respecto a la segunda alícuota.

20 Las células T ocupan una posición central en la compleja red de la defensa inmunitaria de infecciones microbianas y enfermedades tumorales, coordinando la respuesta inmunitaria y controlando y eliminando patógenos así como células tumorales a través de múltiples funciones efectoras directas e indirectas. Un menoscabo de la compleja función de las células T puede llevar a una activación errónea de células T autoagresivas y provocar enfermedades autoinmunitarias graves asociadas con ello tales como esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (RA) y la diabetes juvenil (diabetes tipo I).

25 En principio, las células T presentan fenotípicamente una gran heterogeneidad así como un amplio espectro de funciones efectoras. De este modo, las células T puede subdividirse, debido a la expresión de las proteínas de superficie CD4 y CD8 grosso modo en células T CD4 positivas (células T auxiliares (Th)) y células T citotóxicas CD8 positivas (CTL).

30 Las células T CD4<sup>+</sup> tienen una importancia central en la activación, polarización y coordinación de la defensa inmunitaria. Las células T CD4<sup>+</sup> se activan a consecuencia de una interacción específica de su receptor de células T con moléculas de MHC clase II cargadas con péptido que se encuentran sobre la superficie de células presentadoras de antígenos (CPA) y controlan a continuación mediante contacto célula-célula y/o la secreción de distintos mensajeros (por ejemplo citocinas, quimiocinas), la producción de anticuerpos mediante células B (rama humoral de la respuesta inmunitaria) y la activación de CTL (rama celular de la respuesta inmunitaria).

35 Las células T CD4<sup>+</sup> puede subdividirse debido a la expresión de proteínas de superficie características y la producción de citocinas marcadoras en células T auxiliares 1 (Th-1), células T auxiliares 2 (Th-2) y células T auxiliares 17 (Th-17). Las células Th-1 se caracterizan por la producción de las citocinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  así como la expresión del factor de transcripción T-bet. Las células Th-1 apoyan el valor de una respuesta inmunitaria medida por células eficiente, promoviendo la activación y diferenciación de macrófagos, células T citotóxicas CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, células T citotóxicas CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> pero también células citolíticas naturales (células NK) y células NKT. Las células Th-2 se caracterizan por la secreción de las citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 así como la producción del factor de transcripción GATA-3 y apoyan la producción así como el cambio de clase de anticuerpos (rama humoral del sistema inmunitario) en células B. Las células Th-17 se caracterizan por la producción de las citocinas IL-17, TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IL-6 y parecen desempeñar un papel significativo en enfermedades autoinmunitarias reumatológicas. Además de Th-1, Th-2 y células Th-17, con las células T reguladoras se definió una población adicional de células T CD4<sup>+</sup>, que desempeña un papel significativo en el debilitamiento de respuestas inmunitarias, la tolerancia oral así como el impedimento de enfermedades autoinmunitarias. Las células T reguladoras pueden subdividirse en células T reguladoras naturales CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CTLA4<sup>+</sup> (Treg) así como células Th-3 y Tr-1, que se caracterizan por la producción de las citocinas TGF- $\beta$  (células Th-3) o IL-10 (células Tr-1).

40 Las CTL desempeñan un papel central en la lucha de células y tejidos infectados con microorganismos y parásitos así como de células tumorales, destruyéndose estos mediante mecanismos efectores directos, tales como el reparto de sustancias citotóxicas (por ejemplo perforina, granzima) y el desencadenamiento de la apoptosis. Además las CTL con la secreción de citocinas inmunoestimuladoras (IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-15) y quimiocinas (MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , Rantes) así como distintos factores antivirales solubles (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , CAF) disponen de funciones efectoras específicas, en parte muy específicas, que contribuyen de manera muy eficiente a la limitación de la replicación y la propagación de patógenos. Además se describieron poblaciones adicionales de células T citotóxicas, que presentan un fenotipo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup>, CD4<sup>dim</sup>CD8<sup>bright</sup> o CD4<sup>hi</sup>CD8<sup>hi</sup>).

60 Por lo tanto, las células T representan un mecanismo de protección significativo del sistema inmunitario adquirido para la prevención y el control de enfermedades microbianas y en particular inducidas por virus así como para el reconocimiento y la destrucción de células tumorales.

65 La activación, polarización y regulación de células T específicas están sujetas a un estrecho control por las CPA y se determina esencialmente por el subtipo y el grado de maduración de las CPA, el mecanismo de captación de

antígenos y presentación así como propiedades intrínsecas del inmunógeno respectivo. En este sentido, la dosis y la localización de un inmunógeno así como el contenido de sustancias inmunomoduladoras, deciden si se desarrolla una reacción inmunitaria mediada por Th-1, Th-2 o Th-17 o si se induce una tolerancia.

5 Las CPA profesionales, tales como las células dendríticas (DC), monocitos y macrófagos, pero también las células B ocupan una posición clave en la interfaz entre el sistema inmunitario congénito y adquirido, reconociendo específicamente agentes patógenos y células tumorales, absorbiéndolos y presentando sus fragmentos junto con moléculas de MHC de las clases I y II en células T. Además, los fibroblastos de la piel, células epiteliales del timo y de la glándula tiroidea, células gliales, células beta del páncreas así como células endoteliales vasculares funcionan como CPA no profesionales. Además, exámenes actuales prueban que también las células T pueden funcionar como CPA. Estas células T CPA se generan mediante la transferencia intercelular de moléculas de MHC de clase I y II así como moléculas coestimuladoras, por ejemplo CD80, ligando CD40 (CD40L), ligando OX40 (OX40L) y ligando 4-1BB (4-1BBL, TNFSF9), a consecuencia de un contacto con una CPA, en particular una DC (Sokke Umeshappa et al. (2009), J. Virol. 182:193-206).

15 Para una estimulación satisfactoria de células T por CPA son necesarias tres señales independientes entre sí: el reconocimiento específico de moléculas de MHC cargadas con péptido por medio del receptor de células T (TCR) (señal 1), la interacción de moléculas coestimuladoras continuas de CPA y células T y sus ligandos (señal 2), así como la presencia de citocinas polarizantes de células T, tales como IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4, IL-6 y TGF- $\beta$  (señal 3).

20 Las proteínas solubles, presentes extracelularmente, se degradan habitualmente a través de la ruta de procesamiento de antígenos exógenos y los péptidos generados en el complejo con moléculas de MHC-II se presentan sobre la superficie de CPA. Los péptidos complejados con moléculas de MHC de clase II se reconocen por las células T CD4<sup>+</sup> (células T auxiliares).

25 Por el contrario, la degradación de proteínas presentes en el citosol tiene lugar por medio de la ruta de procesamiento endógena, que lleva a una presentación de los epítomos generados sobre moléculas de MHC de clase I. Estos complejos péptido/MHC-I se transportan hasta la superficie de CPA, donde se presentan las células T citotóxicas (CTL). Aunque la pluralidad de los epítomos presentados sobre moléculas de MHC de clase I proceden de proteínas endógenas y los péptidos complejados con moléculas de MHC-II de proteínas exógenas, esta separación no es absoluta. De este modo, por ejemplo distintos inmunógenos presentes de manera exógena, tales como estructuras particuladas, distintas partículas de virus, inmunocomplejos y lipoproteínas llegan, por medio de un mecanismo denominado presentación cruzada, a la ruta de procesamiento endógena para la presentación de epítomos sobre moléculas de MHC-I.

35 Para una activación específica de células T vírgenes es necesaria, además del reconocimiento de moléculas de MHC cargadas con péptido (señal 1), una segunda señal coestimuladora (señal 2). Esta se desencadena mediante la interacción de distintos ligandos coestimuladores, continuos de CPA y células T con sus receptores. Entre los representantes más significativos de moléculas coestimuladoras figuran miembros de la superfamilia de TNF/receptor de TNF así como de la superfamilia de inmunoglobulinas. En ausencia de la señal coestimuladora se anergia la célula T. La anergia describe un estado en el que las células T no se multiplican y no reaccionan contra un antígeno.

45 La expresión de señales coestimuladoras sobre CPA se controla esencialmente mediante estímulos exógenos, por ejemplo constituyentes de patógenos o tejidos que han experimentado un traumatismo, así como citocinas. La activación y maduración de CPA da como resultado una expresión aumentada de citocinas proinflamatorias y polarizantes de células T así como de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40), mediante lo cual se aumenta drásticamente la capacidad de las CPA para la activación de reacciones inmunitarias mediadas por células. El reconocimiento de antígenos específico por los TCR y la interacción con moléculas coestimuladoras induce una activación y proliferación dirigida de células T vírgenes específicas de agentes patógenos o de enfermedad. Esto va acompañado de una secreción aumentada de IL-2 y la expresión del ligando CD40, que desempeñan un papel importante en la posterior activación y expansión de otras subpoblaciones de células T específicas. La polarización de células T activadas en células efectoras Th-1 o Th-2 tiene lugar en función del grado de maduración de las CPA, el medio de citocinas imperante así como propiedades intrínsecas y la dosis del antígeno presente.

55 La manifestación de una respuesta de células T específica en el transcurso de una infección microbiana aguda tiene lugar habitualmente en tres etapas: durante la fase efectora se activan células T vírgenes específicas de antígeno por el contacto con CPA cargadas con antígeno, lo que lleva a una expansión drástica de las células T específicas, la manifestación de funciones efectoras y la migración de las células T efectoras activadas al sitio de infección. Esta fase efectora se extiende habitualmente a lo largo de 1 a 2 semanas hasta la eliminación del agente patógeno. En la fase de contracción de varias semanas posterior mueren más del 90 % de las células T efectoras formadas. Solamente pocas células T específicas de antígeno sobreviven y se diferencian dando células T de memoria longevas. En la fase de memoria, las células T de memoria persisten durante muchos años en el organismo con un número de células relativamente estable. Estas células T de memoria pueden reactivarse rápidamente con un nuevo contacto con su antígeno y ejercer su función efectora.

Para evitar reacciones inmunitarias indeseadas contra proteínas y tejido propios del organismo se eliminan o inactivan (anergia) células T autorreactivas prematuramente mediante depleción clonal. La consecuencia es una tolerancia específica de antígeno contra estructuras propias del organismo, tales como proteínas, células, tejido y órganos. En las enfermedades autoinmunitarias, estos mecanismos de protección están perturbados o solo se

5 manifiestan de forma insuficiente. Existe una serie de indicaciones sobre que las enfermedades autoinmunitarias se adquieren por una "sensibilidad" congénita, (disposición genética), en combinación con influencias externas, por ejemplo infecciones microbianas, el embarazo o debido a la similitud de estructuras propias del organismo con polipéptidos específicos de agentes patógenos y de tejido extraño, el denominado mimetismo molecular.

10 Además, las células T activadas desempeñan un papel central también en la formación de infecciones por virus crónicas y el rechazo de tejidos y órganos trasplantados.

La determinación del fenotipo, de la frecuencia, de la especificidad, funcionalidad y del estado de activación de células T representa una estrategia eficiente, para obtener una explicación sobre un curso de enfermedad actual o

15 sobre enfermedades ya superadas. Además, los procedimientos de este tipo son de gran importancia por ejemplo para la observación (monitorización) de respuestas de células T específicas en vacunaciones terapéuticas y profilácticas, así como para la detección de diagnóstico del número y la funcionalidad de células T en inflamaciones crónicas, enfermedades autoinmunitarias y en el rechazo de trasplantes.

En las últimas décadas se desarrollaron distintas tecnologías para la detección de células T, que pueden clasificarse

20 grosso modo en dos categorías. El primer grupo de procedimiento se basa en la identificación y cuantificación directas de células T específicas de polipéptido con el uso de multímeros de péptido-MHC, tales como por ejemplo tetrámeros (Beckman Coulter), pentámeros (Proimmune) y estreptámeros (IBA). Este procedimiento permite una determinación de células T específicas de epítipo con restricción de MHC conocida. Un análisis de la funcionalidad

25 de células T no es posible con este procedimiento. Las limitaciones más importantes en el caso del uso de multímeros de péptido/MHC para la monitorización rutinaria de células T específicas de enfermedad o de agente patógeno resultan de que los multímeros de MHC/péptido son tanto específicos de epítipo como específicos de HLA. Por lo tanto, una monitorización exhaustiva de células T específicas de agente patógeno o de enfermedad en

30 sujetos de ensayo con diferente constelación de HLA, requiere el uso de un amplio espectro de diferentes multímeros de péptido/MHC, lo que está relacionado con un gasto elevado. Además, estos multímeros de péptido/MHC se encuentran disponibles hasta el momento solo para un espectro limitado de moléculas de MHC.

Un procedimiento adicional para la determinación de células T específicas se basa en el uso de moléculas de HLA

35 cargadas con péptido, que están acopladas con proteína fluorescente verde (GFP). El reconocimiento específico de epítipo y la unión de estos complejos mediante los receptores de células T lleva a una internalización de los péptidos marcados con GFP, mediante lo cual puede verse la CTL correspondiente (Tomaru et al. (2003), Nat Med. 9:469).

Por el contrario, los procedimientos "funcionales" para la monitorización de células T específicas se basan en la

40 estimulación *ex vivo* de materiales de paciente que contienen células T y CPA con antígenos estimuladores y la posterior detección de procesos de maduración, tales como proliferación, producción de citocinas marcadoras, en células T reactivadas específicamente por medio de distintos sistemas de detección. La detección de células T CD4<sup>+</sup> específicas tiene lugar en este sentido habitualmente mediante la estimulación de muestras de paciente que contienen CPA y células T, por ejemplo sangre completa heparinizada o células mononucleares periféricas aisladas

45 de las sangre (PBMC) con proteínas, polipéptidos o péptidos con una longitud de 15 a 25 aminoácidos y la detección de la activación de células T específica mediante la determinación de la producción de citocinas marcadoras características o de la proliferación de células T. La detección de citocinas tiene lugar por ejemplo por medio de procedimientos de citometría de flujo, tales como tinción de citocinas intracelular y el ensayo de secreción de citocinas así como la técnica ELISpot o ELISA. La determinación de la proliferación de células T puede determinarse

50 por ejemplo por medio de un ensayo de proliferación de bromodesoxiuridina (BrdU) o carboxilfluoresceína diacetato succinimidiléster (CSFE).

Por el contrario, la detección de células T CD8<sup>+</sup> específicas (CTL) tiene lugar habitualmente mediante la simulación

55 de muestras de paciente que contienen CPA y células T con péptidos cortos con una longitud de 8 a 16 aminoácidos. Además, mediante la infección con virus o bacterias recombinantes, que expresan las estructuras objetivo de células T de manera intracelular en CPA y la posterior determinación de citocinas marcadoras producidas por células T específicas de antígeno, principalmente IFN- $\gamma$ , por medio de procedimientos de citometría de flujo, por ejemplo tinción de citocinas intracelular o con el uso de la tecnología de ELISpot o ELISA, pueden detectarse específicamente CTL. Como alternativa, la detección específica de CTL puede tener lugar por medio de un ensayo

60 de liberación de <sup>51</sup>Cromo o con el uso de procedimientos no radioactivos adecuados, tal como por ejemplo la prueba de citotoxicidad de lactato-deshidrogenasa (por ejemplo de Clontech).

Estas tecnologías disponibles permiten una determinación de células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> de memoria específicas de

65 enfermedad y de agente patógeno, pero no son adecuadas o solo de forma muy limitada para la detección de células T auxiliares activadas, que solo aparecen de forma transitoria en procesos patológicos activos.

Las células T CD4<sup>+</sup> se activan de forma transitoria en procesos patológicos e infecciones microbianas activas. La activación transitoria significa, en este sentido, que estas células T solo están presentes a lo largo de un periodo de tiempo determinado, relativamente corto. Por lo tanto, las células T auxiliares activadas representan un objeto importante para una detección de procesos patológicos activos. Una detección con la mayor información posible es necesaria para determinar con exactitud las células T activadas en el marco de un diagnóstico de enfermedades infecciosas activas y enfermedades autoinmunitarias.

Para determinadas aplicaciones, en las que debe diferenciarse entre células T activadas y no activadas, tales como por ejemplo en la detección de células T activadas en infecciones microbianas agudas y reactivaciones o la detección de células T autoagresivas activadas en caso de la sospecha de esclerosis múltiple o diabetes tipo 1, sin embargo no puede aplicarse o solo puede aplicarse de manera muy limitada en los procedimientos basados en la reestimulación *in vitro* de células T de memoria.

Los métodos disponibles hasta el momento para la detección de células T CD4<sup>+</sup> activadas presentan hasta el momento una baja sensibilidad y son por lo tanto desventajosas. La causa de esta baja sensibilidad se basa, entre otras, en que se determinan directamente células T CD4<sup>+</sup> activadas específicas de agente patógeno o de enfermedad y habitualmente solo están presentes en escasa medida en el material del paciente. Este bajo número de células T activadas específicamente presentes dificulta sin embargo una detección fiable y unívoca, que corresponde también a requisitos de diagnóstico, especialmente se queda por debajo con frecuencia del límite de detección de estos métodos disponibles hasta el momento.

De este modo, los procedimientos disponibles hasta el momento para la detección de células T auxiliares activadas específicas de antígeno por ejemplo se basan en la determinación por citometría de flujo de proteínas, que se expresan de forma transitoria sobre la superficie de células T activadas. A estas pertenecen en particular el ligando CD40 y la proteína CD25. El ligando CD40 solo puede determinarse con dificultad por citometría de flujo, porque la unión de anticuerpos lleva a una internalización del ligando CD40. Por el contrario, la proteína CD25 no solo puede encontrarse sobre células T auxiliares activadas sino también sobre células T reguladoras y por lo tanto no es adecuada para una diferenciación segura de estas dos subpoblaciones de células T auxiliares. Además, la expresión aumentada de HLA-DR y CD69 así como una expresión reducida de CD27 representan marcadores adicionales para células T activadas. La detección de células T específicas de antígeno activadas requiere en este caso una detección conjunta de marcadores para la determinación de la especificidad, por ejemplo con el uso de tetra-, penta- o estreptámeros específicos, del fenotipo, por ejemplo mediante determinación de marcadores de superficie característicos, y/o de la activación de células T, por ejemplo mediante la producción de citocinas marcadoras, tras una reestimulación específica. En los procedimientos conocidos hasta el momento es desventajoso además que la detección fiable de algunas proteínas marcadoras por medio de la tecnología de ELISA, ELISpot o FACS no sea posible debido a la localización de membrana de las proteínas marcadoras, la existencia de proteínas marcadoras preformadas en vesículas intracelulares y la alta reactividad inespecífica de los anticuerpos disponibles con proteínas celulares.

Existe por lo tanto la necesidad de un procedimiento que permita detectar, diferenciar y cuantificar poblaciones de células T específicas, que se activan por antígenos bacterianos, virales, parasitarios o autoantígenos, y de esta manera, estas poblaciones de células T pueden asociarse a enfermedades y estadios de enfermedad concretos.

La presente invención se basa en el objetivo de proporcionar un procedimiento que permita tanto una detección cualitativa y sensible como una detección cuantitativa de células T específicas de agente patógeno o de enfermedad de poblaciones de células T determinadas.

La invención se basa además en el objetivo de proporcionar un procedimiento que permita una diferenciación de células T determinadas, tales como, por ejemplo células T vírgenes específicas de antígeno, células T activadas y células T de memoria como diferentes poblaciones de células T específicas.

El objetivo en el que se basa la invención se consigue mediante el objeto definido en las reivindicaciones.

Las siguientes figuras sirven para explicar la invención.

La Figura 1 muestra una representación esquemática (A) del principio de las tecnologías usadas hasta el momento de acuerdo con el estado de la técnica conocido y (B) del procedimiento de acuerdo con la invención para la detección de células T específicas.

La Figura 2 muestra en la representación de transferencia puntiforme el número de células B con proteína 4-1BBL detectable intracelularmente en cocultivos no estimulados y estimulados específicamente con la proteína de fusión ESAT-6/CFP-10 de PBMC y células T específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivada *ex vivo* de un donante de sangre con una tuberculosis latente. Las células T auxiliares específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas expandidas *in vitro* se mezclaron 1:1 con PBMC autólogas y se cocultivaron en presencia o ausencia de ESAT-6/CFP-10 10 µg/ml durante 18 h. Durante las últimas 16 h se inhibió la secreción de proteínas mediante brefeldina A. La detección de 4-1BBL intracelular en las células B tuvo lugar mediante citometría de

flujo.

La Figura 3 muestra en un diagrama el aumento relativo de la síntesis de ARNm de 4-1BBL en PBMC cargadas con ESAT-6/CFP-10 en comparación con PBMC no cargadas tras cocultivo con células T auxiliares específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas expandidas *in vitro* autólogas mediante RT-qPCR. PBMC recién aisladas de un donante con una infección latente por *M. tuberculosis* se incubaron durante 12 horas con ESAT-6/CFP-10 10 µg/ml y a continuación se cocultivaron en la relación de 1:1 con células T auxiliares específicas de ESAT-6/CFP-10 autólogas expandidas *ex vivo*. Un cocultivo de células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 y PBMC no cargadas sirvió como control negativo. En los momentos indicados se recogieron las preparaciones de estimulación y se determinó el aumento relativo de la expresión de ARNm de 4-1BBL en cultivos celulares estimulados de manera específica en comparación con cultivos celulares no estimulados por medio de RT-qPCR. Los datos de la RT-qPCR se evaluaron según el método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , sirviendo la GAPDH como gen de referencia y el control no estimulado como calibrador.

La Figura 4 muestra en un diagrama la correlación del aumento relativo de la producción de ARNm de 4-1BBL en PBMC cargadas con ESAT-6/CFP-10 frente a PBMC no cargadas con el número de células T auxiliares específicas de ESAT-6/CFP-10 activadas específicas de antígeno determinada mediante RT-qPCR.  $1 \times 10^6$  PBMC recién aisladas de un donante con una infección latente por *M. tuberculosis* se cultivaron con números crecientes de células T auxiliares específicas de ESAT-6/CFP-10 expandidas *ex vivo* en presencia de ESAT-6/CFP-10 10 µg/ml. Cocultivos no estimulados de PBMC autólogas y células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas sirvieron como control. En los momentos indicados se recogieron  $2 \times 10^5$  células y se determinó el aumento relativo de la concentración de ARNm de 4-1BBL en células estimuladas de manera específica en comparación con células no estimuladas por medio de RT-qPCR. Los datos de la RT-qPCR se evaluaron según el método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , sirviendo la GAPDH como gen de referencia y el control no estimulado como calibrador.

La Figura 5 muestra en (A) en un diagrama el aumento relativo de la producción de ARNm de 4-1BBL en PBMC cargadas con ESAT-6/CFP-10 y PBMC no cargadas a consecuencia de un cocultivo con células T auxiliares específicas de ESAT-6/CFP-10 autólogas preactivadas *ex vivo* determinada mediante RT-qPCR.  $1 \times 10^6$  PBMC recién aisladas de un donante con una tuberculosis latente se cocultivaron con 50000 células T auxiliares específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas *ex vivo* en presencia y ausencia de ESAT-6/CFP-10 10 µg/ml. En los momentos indicados se extrajeron  $2 \times 10^5$  células, se sedimentaron y se congelaron en nitrógeno líquido. El aumento relativo del ARNm de 4-1BBL en cultivos celulares estimulados de manera específica en comparación con células no estimuladas se determinó por medio de RT-qPCR. Los datos de la RT-qPCR se evaluaron según el método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , sirviendo GAPDH como gen de referencia y el control no estimulado como calibrador. (B) muestra en un diagrama el aumento relativo de la producción de ARNm de IFN- $\gamma$  en el transcurso del cocultivo de PBMC cargadas con ESAT-6/CFP-10 y no cargadas con células T auxiliares específicas de ESAT-6/CFP-10 autólogas preactivadas *ex vivo* determinado por medio de RT-qPCR.  $1 \times 10^6$  PBMC recién aisladas de un donante con una tuberculosis latente se cocultivaron con 50000 células T auxiliares específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas *ex vivo* en presencia y ausencia de ESAT-6/CFP-10 10 µg/ml. En los momentos indicados se extrajeron  $2 \times 10^5$  células, se sedimentaron y se determinó el aumento relativo del ARNm de IFN- $\gamma$  en cultivos celulares estimulados de manera específica en comparación con cultivos celulares no estimulados por medio de RT-qPCR. Los datos de la RT-qPCR se evaluaron según el método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , sirviendo la GAPDH como gen de referencia y el control no estimulado como calibrador.

La Figura 6 muestra en un diagrama la especificidad de antígeno de la inducción de la síntesis de ARNm de 4-1BBL mediante células Th activadas determinadas por medio de la técnica de RT-qPCR. Las células T específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas muestran, en comparación con células T no específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas por perlas Expandar, una capacidad claramente mejorada para la inducción de la producción de ARNm de 4-1BBL en cultivos celulares estimulados con ESAT-6/CFP-10 frente a cultivos celulares no estimulados. Las células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas de manera no específica con perlas Expandar y células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas de manera específica se cocultivaron con PBMC autólogas en presencia y ausencia de ESAT-6/CFP-10 10 µg/ml, empleándose diferentes números de células T con  $1 \times 10^6$  PBMC recién aisladas. En los momentos indicados se extrajeron en cada caso  $2 \times 10^5$  células, se sedimentaron y el contenido relativo de ARNm de 4-1BBL se cuantificó por medio de RT-qPCR. Los datos de la RT-qPCR se evaluaron según el método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , usándose la GAPDH como gen de referencia y el control no estimulado como calibrador.

La Figura 7 muestra en un diagrama adicional la especificidad de antígeno de la inducción de la síntesis de ARNm de 4-1BBL mediante células Th activadas determinada por medio de la técnica de RT-qPCR. Las células T específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas inducen solo en cultivos celulares estimulados con ESAT-6/CFP-10, pero no en cultivos celulares estimulados con proteína BZLF1 de VEB o pp65 de CMV una inducción aumentada de la producción de ARNm de 4-1BBL.  $1 \times 10^6$  PBMC de un donante con una infección persistente por *M. tuberculosis* se cocultivaron con aproximadamente 70000 células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas en presencia de ESAT-6/CFP-10 10 µg/ml, BZLF1 de VEB o pp65 de CMV. Como control adicional sirvieron cocultivos no estimulados de PBMC y células T preactivadas. En los momentos indicados se extrajeron de la preparación en cada caso  $2 \times 10^5$  células y se cuantificó el contenido relativo de ARNm de 4-1BBL en una

RT-qPCR. Los datos de la RT-qPCR se evaluaron según el método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , usándose la GAPDH como gen de referencia y el control no estimulado como calibrador.

La Figura 8 muestra en un diagrama adicional la especificidad de antígeno de la inducción de la síntesis de ARNm de 4-1BBL mediante células Th activadas determinada por medio de la técnica de RT-qPCR. Las células Th específicas de ESAT-6/CFP-10, BZLF1 de VEB y pp65 de CMV preactivadas muestran solo en cocultivos estimulados con su antígeno objetivo respectivo una inducción aumentada de la producción de ARNm de 4-1BBL. (A) a (C) muestran diagramas para la inducción de la síntesis de ARNm de 4-1BBL mediante células Th específicas de pp65 de CMV, BZLF1 de VEB y ESAT-6/CFP-10 de *M. tuberculosis* en (A) PBMC cargadas con ESAT-6/CFP-10 de *M. tuberculosis*, (B) pp65 de CMV y (C) BZLF1 de VEB determinada mediante RT-qPCR. En cada caso  $1 \times 10^6$ /ml PBMC se cocultivaron con aproximadamente 070000 células Th específicas de pp65, BZLF1 y ESAT-6/CFP-10 expandidas *ex vivo* en presencia y como control en ausencia de en cada caso ESAT-6/CFP-10 10  $\mu$ g/ml, (B) pp65 o (C) BZLF1. En los momentos indicados se extrajeron de la preparación  $2 \times 10^5$  células, se aisló el ARN total y se transcribió en ADNc y el contenido relativo de ARNm de 4-1BBL se cuantificó por medio de una RT-qPCR. Se evaluó según el método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  con el uso de GAPDH como gen de referencia y el control no estimulado como calibrador.

La Figura 9 muestra en un diagrama el aumento de la sensibilidad del procedimiento de RTT de acuerdo con la invención mediante el uso de un anticuerpo de bloqueo de MHC-I (W6/32), determinado mediante RT-qPCR. PBMC cargadas con BZLF1 de VEB 10  $\mu$ g/ml y no cargadas se cocultivaron con células Th específicas de BZLF1 preactivadas *in vitro* en presencia y ausencia de 10  $\mu$ g/ml del anticuerpo de bloqueo de MHC-I W6/32. En los momentos indicados se extrajeron  $2 \times 10^5$  células y se purificó el ARN y se analizó por medio de la tecnología de RT-qPCR. Los datos de la RT-qPCR se evaluaron según el método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , usándose la GAPDH como gen de referencia.

La Figura 10 muestra en (A) a (E) en diagramas, que donantes con (D) una tuberculosis activa en comparación con donantes con (B) una infección latente por *M. tuberculosis*, (C) una infección por TB tratada, así como en comparación con (A) donantes sanos, presentan una inducción relativa aumentada de forma medible de la producción de ARNm de 4-1BBL en PBMC estimuladas de forma específica en comparación con PBMC no estimuladas. De la sangre completa heparinizada, recién aislada de tres (A) donantes sanos no infectados con *M. tuberculosis* (p012, p010, p008), (B) donantes sanos con una infección latente por tuberculosis (p009, p006, p005), (C) donantes, que debido a una tuberculosis activa en los últimos 6 meses se trataron con medicamentos antes del ensayo (p013, p014, p003) y (D) donantes con tuberculosis activa antes o poco después del comienzo de una terapia causal (p001, p004, p007), se aislaron PBMC y se incubaron presencia o ausencia de ESAT-6/CFP-10 10  $\mu$ g/ml. (E) Para el control se estimularon PBMC de donantes seleccionados, donantes VIH seronegativos con proteína de la cápside p24 de VIH 10  $\mu$ g/ml (p005, p008, p007, p006, p003) o albúmina de suero bovino (p001). En los momentos indicados se recogieron células y se analizó la expresión de 4-1BBL en células estimuladas y no estimuladas por medio de RT-qPCR. Los resultados se evaluaron con el método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ . A este respecto, GAPDH sirvió como gen de referencia.

La Figura 11 muestra en (A) a (C) en diagramas, que PBMC estimuladas con tuberculina PPD de un donante con (A) una tuberculosis activa en comparación con PBMC de un donante con (B) una infección latente por *M. tuberculosis* así como (C) de un donante sano, presentan una inducción relativa aumentada de la producción de ARNm de 4-1BBL en PBMC estimuladas de forma específica en comparación con PBMC no estimuladas.  $1 \times 10^6$  PBMC recién aisladas/ml de donantes con (A) una TB activa, (B) una TB latente y (C) de un donante sano no infectado con *M. tuberculosis* se estimularon con ESAT-6/CFP-10 10  $\mu$ g/ml o tuberculina PPD o - como control positivo – con, respectivamente, 1  $\mu$ g/ml de PMA/ionomicina. En los momentos indicados se extrajeron  $0,5 \times 10^6$  células y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ . De las células se aisló el ARN total y se transcribió en ADNc y se determinó el contenido de ARNm de 4-1BBL por medio de una RT-qPCR. Se evaluó según el método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  con el uso de GAPDH como gen de referencia y el control no estimulado como calibrador.

La Figura 12 muestra en (A) y (B) en diagramas la inducción no específica de la producción de ARNm de 4-1BBL en PBMC de un sujeto de ensayo sano tras estimulación con, respectivamente, 1  $\mu$ g/ml de PMA/ionomicina en (A), o PGE2/ $\alpha$ -CD40 en (B), en comparación con el control no estimulado, determinada mediante RT-qPCR. PBMC recién aisladas de un sujeto de ensayo sano se incubaron con, respectivamente, 1  $\mu$ g/ml de PMA/ionomicina en (A) o con 5  $\mu$ g/ml de PGE<sub>2</sub> y 2  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -CD40 (B). En los momentos indicados se extrajeron  $0,5 \times 10^6$  células, se sedimentaron y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta el procesamiento adicional. De las células se aisló el ARN total y se transcribió en ADNc. A continuación se determinó en una RT-qPCR el contenido del ADNc de 4-1BBL. Se evaluó según el método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  con el uso de GAPDH como gen de referencia y el control no estimulado como calibrador.

La Figura 13 muestra en un diagrama la influencia de diferentes genes de referencia sobre el aumento relativo determinado de la producción de ARNm de 4-1BBL en células T estimuladas con ESAT-6/CFP-10 frente a cocultivos no estimulados de células T activadas específicas de ESAT-6/CFP-10 y PBMC autólogas de un donante con tuberculosis persistente determinada mediante RT-qPCR. Las PBMC recién aisladas de un donante con una tuberculosis persistente se incubaron con células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas en

presencia y ausencia de proteína ESAT-6/CFP-10 10 µg/ml. En los momentos indicados se extrajeron 0,5X10<sup>6</sup> células, se sedimentaron y se almacenaron a -80 °C hasta el procesamiento adicional. De las células se aisló el ARN total y se transcribió en ADNc. A continuación se determinó en una RT-qPCR el contenido del ADNc de 4-1BBL. Se evaluó según el método de 2<sup>-ΔΔCq</sup> con el uso de GAPDH, huP0 y PBGD como genes de referencia y el control no estimulado como calibrador.

La Figura 14 muestra una gráfica de amplificación de una PCR en tiempo real para la identificación de un gen de referencia adecuado para el procedimiento de RTT. En el eje y están representados los ciclos de cuantificación (Cq) para 7 genes de referencia potenciales en cuatro condiciones de estimulación (no estimulado, tuberculina (PPD), ESAT6/CFP10, PMA/ionomicina) por triplicado a modo de ejemplo para una muestra. El corte ampliado muestra el orden de las condiciones de estimulación para los, en cada caso, 12 puntos de datos. En el eje x está indicada la posición de placa sobre la placa de 96 pocillos. 18S: ARN ribosómico 18S eucariota; ALAS: aminolevulinato, delta-, sintasa 1; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; GUSB: glucuronidasa, beta; HMBS: hidroximetilbilano sintasa; HPRT1: hipoxantina fosforribosiltransferasa 1; Iono: ionomicina; PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato; PPD: tuberculina PPD; RPLP0: proteína ribosómica, grande, P0; TAF1A: factor asociado a proteína de unión a caja TATA (TBP), ARN polimerasa I, A, 48 kDa; no estim.: no estimulado.

La Figura 15 muestra el aumento de la expresión relativa del gen marcador de RTT 4-1BBL – también denominado *TNFSF9* – en muestras de pacientes con TB infectados de manera activa o latente así como sujetos de ensayo vacunados con BCG sanos o no vacunados sanos tras estimulación con tuberculina PPD en comparación con las muestras no estimuladas correspondientes. Los valores se normalizaron frente al gen de referencia *TAF1A* (2<sup>-ΔΔCq</sup>). Por cada preparación se estimularon 5 x 10<sup>6</sup> PBMC en medio de células B con tuberculina PPD 10 µg/ml. Activos: pacientes con una tuberculosis activa; latentes: pacientes con una tuberculosis latente; BCG: Bacillus Calmette-Guérin, vacuna viva atenuada frente a la tuberculosis.

La Figura 16 muestra la influencia de diferentes medios de cultivo sobre el aumento relativo de la señal de expresión de *IFN-γ* – también denominado *IFNG* – en PBMC de pacientes con una TB latente y sujetos de ensayo sanos tras estimulación con tuberculina PPD en comparación con muestras no estimuladas y normalización frente a *TAF1A*. Se usaron medio de células B (BZM+), medio de células B sin IL-4 (BZM-), medio UltraCULTURE™ sin suero (Ultra) de LONZA y medio AIM V (AIMV) de Invitrogen.

La Figura 17 muestra la influencia de diferentes medios de cultivo celular sobre el aumento relativo de la señal de expresión de 4-1BBL – también denominada *TNFSF9* – en PBMC de pacientes con una TB latente y sujetos de ensayo sanos tras estimulación con tuberculina PPD en comparación con muestras no estimuladas y normalización frente a *TAF1A*. Se usaron medio de células B (BZM+), medio de células B sin IL-4 (BZM-), medio UltraCULTURE™ sin suero (Ultra) de LONZA y medio AIM V (AIMV) de Invitrogen.

La Figura 18 muestra los resultados para la detección simultánea de los aumentos de expresión relativos de *TNFSF9* e *IFNG* con normalización frente a *TAF1A* como gen de referencia en una preparación de qPCR triple (izquierda) en comparación con las correspondientes reacciones dobles (derecha). No estim.: no estimulado; PPD: tuberculina PPD; PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato/ionomicina.

La Figura 19 muestra el aumento de expresión relativo de los genes *FCGR1ABC*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11* en muestras de un sujeto de ensayo sano y de un paciente con una TB latente tras estimulación con tuberculina PPD en comparación con las muestras no estimuladas correspondientes. La qPCR en tiempo real se llevó a cabo con el sistema SYBR Green. En el eje x están representados los genes o sujetos de ensayo. El eje y muestra el aumento de expresión relativo (2<sup>ΔCq</sup>). BCG: Bacillus Calmette-Guérin, vacuna viva atenuada frente a la tuberculosis; *CXCL9* a *11*: ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 9 a 11; *FCGR1ABC*: receptor Fc gamma 1 A, B, C.

En relación con la presente invención, por una “población de células T” se entiende un grupo definido de células T con un fenotipo determinado. Poblaciones de células T de acuerdo con la invención son en particular células T vírgenes, células T activadas y células T de memoria.

En relación con la presente invención, por la expresión “células T” se entienden linfocitos T, tales como células T CD4<sup>+</sup> o células T CD8<sup>+</sup> o una mezcla de células T CD4<sup>+</sup>, y células T CD8<sup>+</sup>. En este sentido, el grupo de las células T CD4<sup>+</sup>, comprende células T auxiliares, por ejemplo células T auxiliares 1 (Th-1), células T auxiliares 2 (Th-2), células T auxiliares 17 (Th-17), células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg), células Tr-1 y células T auxiliares 3 (Th-3). El grupo de las células T CD8<sup>+</sup> comprende células T citotóxicas CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y células T, que presentan un fenotipo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup>, CD4<sup>dim</sup>CD8<sup>bright</sup> o CD4<sup>hi</sup>CD8<sup>hi</sup>).

En relación con la presente invención, por una “célula T virgen” se entiende una célula T que presenta una especificidad de antígeno determinada, pero que, sin embargo, no tenía aún ningún primer contacto con su antígeno. Las células T vírgenes tales como las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes presentan por ejemplo CD45RA como marcador sobre su superficie.



- 5 En relación con la presente invención, por una "célula T activada" se entiende una célula T que se estimula a partir de un estado virgen antes de un primer contacto de antígeno mediante el primer contacto de antígeno del receptor de células T. El reconocimiento de un péptido presentado sobre moléculas de MHC por el receptor de células T lleva a un denominado *Crosslinking* (reticulación) del receptor de células T. Un requisito adicional para la activación de células T es una segunda señal, que se media por la interacción de moléculas coestimuladoras y sus ligandos tanto sobre las CPA como también sobre las células T. Esta activación lleva a una cascada de señales dentro de las células T y por último a una proliferación y la manifestación de distintas funciones efectoras. Además las células T activadas se caracterizan por la expresión transitoria de moléculas de superficie características, tales como por ejemplo el ligando CD40, 4-1BB, CD69 y/o CD25. La activación de células T vírgenes para dar células T activadas tras el primer contacto de antígeno sobre la superficie de una célula presentadora de antígenos profesional se denomina también como "*Priming*". La expresión "célula T activada" es sinónimo de la expresión "célula T efectora" y abarca también células T de memoria reactivadas específicamente *in vivo* mediante un nuevo contacto con su antígeno.
- 10
- 15 En relación con la presente invención, por una "célula T de memoria" se entiende una célula T, que tenía y aun contacto de antígeno específico. Las células T de memoria se caracterizan por marcadores de superficie especiales, tales como CD45RO, CD44 y L-selectina.
- 20 En relación con la presente invención, por la expresión "célula presentadora de antígeno" (CPA) se entienden células que pueden absorber polipéptidos, procesarlos y fragmentos de estos polipéptidos, presentar los denominados epítomos al sistema inmunitario en relación con proteínas de MHC I y MHC II. En particular, la expresión "célula presentadora de antígeno" comprende las denominadas células presentadoras de antígenos profesionales, tales como células dendríticas, monocitos, macrófagos, CPA no profesionales, tales como células B, pero también células endoteliales vasculares, fibroblastos de la piel, células epiteliales del timo y de la glándula tiroidea, células gliales del cerebro, células beta del páncreas así como células endoteliales vasculares. Las CPA no profesionales expresan las moléculas de MHC necesarias para la interacción con células T de las clases I y II solo a consecuencia de una activación por citocinas tales como IFN- $\gamma$ . Además, también las células T pueden funcionar como CPA. Estas células T CPA se generan mediante la transferencia intercelular de moléculas de clase I y II de MHC así como de moléculas coestimuladoras, por ejemplo CD80, ligando CD40 (CD40L), ligando OX40 (OX40L) y ligando 4-1BB (4-1BBL, TNFSF9) a consecuencia de un contacto con una CPA, en particular una célula dendrítica (DC).
- 25
- 30 En relación con la presente invención, por un "marcador de las CPA" o por un "marcador de la célula T" se entiende un ácido nucleico, en particular un ARN o un ADN, o un fragmento de ácido nucleico. De acuerdo con la invención está previsto que el marcador tras un reconocimiento específico del antígeno complejo con moléculas de MHC sobre las CPA se aumenta o reduce de forma medible mediante una célula T activada en su expresión de las CPA. De acuerdo con la invención está previsto por lo tanto que el marcador de las CPA se induce por la interacción específica de antígeno de las células T activadas con las CPA y puede detectarse y cuantificarse de este modo.
- 35
- 40 En relación con la presente invención por "inducido" o "inducción" de un marcador se entiende el cambio de la expresión de un marcador. En el caso de que el marcador sea un ácido nucleico, se entiende de acuerdo con la invención por "inducción" la producción aumentada o reducida por ejemplo de ARNm de un gen. Por "inducción" se entiende además de acuerdo con la invención la modulación de un gen, por ejemplo en forma de una metilación. Además, en el contexto de la presente invención se entiende "inducido" la expresión aumentada o reducida de una proteína. La expresión de la proteína puede tener lugar en este sentido tanto sobre la célula como en la célula, es decir, de manera intracelular.
- 45
- 50 En relación con la presente invención, por un "antígeno" se entiende en particular una proteína, un polipéptido o un péptido. Un antígeno es en particular una secuencia de polipéptido, que se absorbe por CPA, se procesa y cuyos fragmentos, los denominados epítomos, se presentan sobre células T de moléculas de MHC. Un antígeno es en particular también un péptido, que se presenta junto con células T de moléculas de MHC. Además, por un antígeno se entiende también un ARN, ADN o un plásmido de expresión, que codifica un polipéptido.
- 55 La expresión usada en este caso "plásmido de expresión" o "vector de expresión" designa constructos creados artificialmente para la introducción y para la expresión de ácidos nucleicos en células. Los vectores de expresión son por ejemplo plásmidos bacterianos y MIDGES, plásmidos derivados de virus, fagémidos, cósmidos, bacteriófagos o ácidos nucleicos producidos artificialmente tales como cromosomas artificiales. Los vectores pueden contener además uno o varios marcadores de selección.
- 60 En relación con la presente invención, por el término "polipéptido" se entiende un polímero de aminoácidos de cualquier longitud. El término "polipéptido" comprende también los términos epítomo objetivo, epítomo, péptido, oligopéptido, proteína, poliproteína y agregado de polipéptidos. Además, por el término "polipéptido" se entienden también polipéptidos, que presentan modificaciones postraduccionales, tales como glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, carbamoylaciones y modificaciones similares. Además, por el término "polipéptido" se entienden también polipéptidos que presentan uno o varios análogos de aminoácidos, tales como por ejemplo aminoácidos no naturales, polipéptidos con enlaces sustituidos así como otras modificaciones, tal como se conocen en el estado de
- 65

la técnica, independientemente de si están presentes en la naturaleza o no son de origen natural.

El término usado en este caso "epítipo" designa la zona de un polipéptido que tiene propiedades antigénicas y sirve por ejemplo como sitio de reconocimiento de células T o inmunoglobulinas. En el sentido de esta invención son epítipos por ejemplo aquellas zonas de polipéptidos que se reconocen por células inmunitarias tales como por ejemplo CD4<sup>+</sup> células T auxiliares, CD8<sup>+</sup> células T citotóxicas, células T citotóxicas CD4<sup>+</sup>CD8<sup>dim</sup>, CD56<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> así como células NK CD56-CD57<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T o células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Un epítipo puede comprender 3 o más aminoácidos. Habitualmente, un epítipo consiste en al menos 5 a 7 aminoácidos o, lo que es más frecuente, de 8 a 11 aminoácidos, o también de más de 11 aminoácidos, o en cambio de más de 20 aminoácidos, incluso más raramente de más de 30 aminoácidos.

En relación con la presente invención, por "reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa con transcripción inversa, RT-qPCR" se entiende un procedimiento que se basa en una reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR). Además, la RT-qPCR permite, además de una reproducción adicionalmente también una cuantificación del ARNm objetivo. En este sentido, a partir de material que a examinarse e incubado con un antígeno y en comparación material no estimulado o incubado con antígeno irrelevante, se aísla el ARN total y a continuación se transcribe en una reacción de transcripción inversa en ADNc. Por el uso de cebadores específicos se reproduce a continuación en la qPCR la secuencia objetivo. Para la cuantificación de la secuencia objetivo pueden emplearse varios procedimientos.

El tipo más sencillo de la cuantificación es a través del uso de colorantes fluorescentes de intercalación, tales como SYBR-Green o EVA-Green. Estos colorantes se adicionan en moléculas de ADN bicatenarias, que se generan durante la elongación de los productos específicos. La detección tiene lugar siempre al final de la etapa de elongación a través de la detección de la luz emitida tras excitación del colorante fluorescente. Con una cantidad creciente de producto de PCR se adiciona más colorante, de modo que aumenta la señal de fluorescencia.

Otro tipo de cuantificación presenta el uso de sondas específicas de secuencia. Existen sondas de hidrólisis (TaqMan) o de hibridación (Light-Cycler). Las sondas de hidrólisis están marcadas en el extremo 5' con un colorante fluorescente y en el extremo 3' con un denominado extintor. El extintor es responsable, debido a la proximidad espacial con el colorante indicador, de la supresión de su señal de fluorescencia y se escinde durante la síntesis del ADN complementario durante la fase de elongación. Siempre que entonces, al final de la elongación del colorante fluorescente se excite a través de una fuente de luz, se libera luz de determinada longitud de onda, que puede detectarse.

Los sistemas de sonda de hibridación se componen de dos sondas que se unen una junto a otra a la secuencia objetivo. Ambas sondas están marcadas con un colorante fluorescente. Por medio de una fuente de luz se excita el primer colorante fluorescente en el extremo 5' de la primera sonda. La luz emitida se transmite entonces mediante transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) al segundo colorante fluorescente en el extremo 3' de la segunda sonda. Con ello se excita el colorante, mediante lo cual se emite luz de una determinada longitud de onda, que puede detectarse. Si en el transcurso de la elongación de la hebra complementaria de la secuencia objetivo se degrada la primera sonda por la polimerasa, ya no puede tener lugar la FRET y la señal de fluorescencia disminuye en consecuencia. La cuantificación tiene lugar en este caso por lo tanto en contraposición a los métodos mencionados anteriormente siempre al principio del proceso de elongación.

Colorantes fluorescentes usados con frecuencia son por ejemplo Fluophor 1, Fluophor 2, aminocumarina, fluoresceína, Cy3, Cy5, europio, terbio, Bodipy, Dansyl, naftaleno, rutenio, tetrametilrodamina, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), VIC, YAK, rodamina y Texas Red. Los extintores usados con frecuencia son por ejemplo TAMRA<sup>TM</sup>, 6-caboxitetrametiloirrodamina, rojo de metilo o Dark-Quencher.

La expresión "Real Time" se refiere a la medición concreta dentro de cada ciclo de una PCR, es decir, en "tiempo real". El aumento de la denominada secuencia objetivo está correlacionado en este sentido con el aumento de la fluorescencia de ciclo a ciclo. Al final de un recorrido, que consiste habitualmente en varios ciclos, se efectúa entonces por medio de las señales de fluorescencia obtenidas la cuantificación en la fase exponencial de la PCR. La medición de la amplificación tiene lugar en este sentido por regla general a través de valores de Cq (*quantification cycle*), que describen el ciclo en el que aumenta la fluorescencia por primera vez significativamente a través de la fluorescencia de fondo. El valor de Cq se determina por un lado para el ácido nucleico objetivo y por otro lado para el ácido nucleico de referencia. De esta manera es posible determinar números de copias absolutos o relativos de la secuencia objetivo.

En relación con la presente invención, por la expresión gen de referencia se entenderá una secuencia a nivel de ARNm como a nivel del ADN genómico. Estos pueden no ser tampoco activos en la transcripción en las condiciones de estimulación de acuerdo con la invención o corresponder a regiones del ADN no codificantes del genoma. Un gen de referencia puede ser de acuerdo con la invención además también un ADN o ARN agregado a la sonda de gen objetivo. El criterio más alto de un gen de referencia es que en el transcurso de la estimulación y mediante las condiciones del procedimiento de acuerdo con la invención no se modifica. De esta manera pueden normalizarse los resultados experimentales en cuanto a la cantidad de plantilla empleada en diferentes preparaciones. El gen de

referencia permite por lo tanto la determinación de la expresión relativa de un gen objetivo. Ejemplos de genes de referencia son, entre otros, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), huP0 (*human acidic protein 0*), porfobilinógeno desaminasa (PBGD),  $\beta$ -actina o tubulina.

5 En un primer objeto de la presente invención está previsto proporcionar un procedimiento para la detección, diferenciación y cuantificación de poblaciones de células T, que comprende las siguientes etapas a) poner en contacto una primera alícuota de un fluido corporal de un individuo con al menos un antígeno, conteniendo el fluido corporal células presentadoras de antígenos (CPA) y células T, b) incubar la primera alícuota con el al menos un antígeno a lo largo de un periodo de tiempo determinado, c) detectar y diferenciar las poblaciones de células T mediante detección de al menos un primer marcador de las CPA inducido por las células T de una población de células T determinada en la primera alícuota y en una segunda alícuota del fluido corporal del individuo, que no se incubó con el al menos un antígeno, mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR), y d) detectar y cuantificar las poblaciones de células T determinando la relación del marcador detectado de las CPA de la primera alícuota con respecto a la segunda alícuota.

15 De acuerdo con la invención está previsto por lo tanto que se lleve a cabo una detección, diferenciación y cuantificación de las células T de una población de células T determinada mediante una detección y una cuantificación relativa de al menos un marcador de las CPA en preparaciones de cultivos celulares no estimuladas y/o no estimuladas de manera específicas mediante la RT-qPCR. El procedimiento de acuerdo con la invención prevé que se permite la detección y la cuantificación por que en particular células T activadas pueden contribuir a través de un mecanismo de reacomplamiento a la maduración de células presentadoras de antígenos (CPA). Este mecanismo de reacomplamiento se designa en el contexto de la presente invención también tecnología de células T inversa (RTT). De este modo, las células T activadas específicas de antígeno inducen, en particular células T auxiliares, mediadas por el reconocimiento de moléculas de MHC cargadas con un antígeno por medio del TCR y la interacción adicional simultánea de la célula T con las CPA una activación, entre otros, por ejemplo de promotores de distintos genes como marcador de las CPA, la producción aumentada de moléculas de ARNm y la expresión aumentada de estas proteínas marcadoras. Mediante estos procesos de maduración la CPA alcanza una capacidad aumentada para la estimulación de células T citotóxicas específicas de agente patógeno o de enfermedad y células T auxiliares menos afines.

20 De acuerdo con la invención está previsto por lo tanto que la detección de células T de una población de células T determinada, tales como células T activadas, tiene lugar mediante una detección indirecta a través de un marcador de las CPA. Sin restringirse a una teoría, está previsto de acuerdo con la invención que las CPA presenten, mediante la incubación con un antígeno fragmentos de este antígeno en relación con moléculas de clase II o I de MHC sobre su superficie de células T activadas. De esta manera se produce una unión específica de las células T activadas en las CPA que presentan el antígeno. Mediante esta interacción específica células T-CPA se estimula de forma específica la CPA. A consecuencia de esta estimulación específica se produce la inducción de un marcador en las CPA. La determinación del marcador en CPA estimuladas de forma específica y en CPA, que no están estimuladas, mediante PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) permite la detección, la diferenciación y la cuantificación de células T activadas como población de células T determinadas.

25 El procedimiento de acuerdo con la invención permite una detección sensible y fiable detección de células T de una población de células T determinada, tales como células T vírgenes, activadas o de memoria. La sensibilidad del procedimiento se basa en particular en que una célula T desencadena en la CPA la estimulación del marcador, entre otras, en forma de una pluralidad de copias de ARNm. Además se discute que mediante una célula T se estimula en determinadas circunstancias un mayor número de CPA, "saltando" por así decirlo una célula T de una CPA a la siguiente. En conjunto, esto lleva a un refuerzo de la señal y con ello a una sensibilidad elevada del procedimiento de acuerdo con la invención.

30 El procedimiento de acuerdo con la invención permite por lo tanto la detección y la diferenciación de determinadas poblaciones de células T y permite con ello en particular una limitación de células T activadas frente a células T de memoria.

35 En una forma de realización preferida de la invención se lleva a cabo, para conseguir una cuantificación de la expresión génica precisa, la normalización de los datos de PCR en tiempo real elevados (datos de Real-Time-PCR) por medio de un valor de referencia fijo, que no se ve afectado por las condiciones del experimento. Para ello se mide conjuntamente la expresión de un gen de referencia, para llevar a cabo una comparación de cantidades relativa.

40 De acuerdo con la invención está previsto que para la determinación del marcador de las CPA se proporcione una primera y una segunda alícuota de un fluido corporal de un individuo. En relación con la presente invención, por "proporcionar" se entiende que la alícuota del fluido corporal ya se encuentra en un recipiente. "Proporcionar" puede significar de acuerdo con la invención también que la alícuota del fluido corporal se pone a disposición directamente por un paciente, por ejemplo mediante la extracción de sangre. El procedimiento de acuerdo con la invención prevé que la primera alícuota se estimule con al menos un antígeno, la segunda alícuota en cambio permanezca no estimulada. En conjunto, está previsto por lo tanto que la primera y segunda alícuota con excepción de la puesta en

contacto con el antígeno sean idénticas. En este sentido, la segunda alícuota no estimulada sirve como una especie de calibrador. La cuantificación se lleva a cabo por lo tanto con respecto al calibrador. Para la determinación y cuantificación del marcador está previsto entonces que la cantidad del marcador en la primera alícuota estimulada se divida entre la cantidad del marcador en la segunda alícuota no estimulada. Se detecta por lo tanto una diferencia de cantidades de n veces del marcador de la primera alícuota estimulada con respecto al calibrador, es decir, la segunda alícuota no estimulada. El procedimiento de acuerdo con la invención representa un procedimiento que se lleva a cabo exclusivamente *ex vivo*.

El procedimiento de acuerdo con la invención permite de manera ventajosamente frente a los procedimientos disponibles conocidos la detección de células T auxiliares activadas con una sensibilidad aumentada, rapidez y fiabilidad de la realización del ensayo. Además el procedimiento de acuerdo con la invención permite una limitación así como una determinación diferencial en particular de células T activadas frente a células T de memoria.

Una rapidez esencial para la detección asegurada de células T activadas en el caso de infecciones microbianas activas y en particular en el caso de enfermedades autoinmunitarias y tumorales se basa en el muy bajo número de las células T activadas específicas de enfermedad o de agente patógeno que se encuentran en la circulación. Las células T se activan en los órganos linfáticos mediante el contacto con CPA cargadas con antígeno, proliferan y se desplazan entonces a través de la sangre o la linfa al sitio de la infección o enfermedad, donde se detienen con frecuencia y ejercen sus funciones efectoras.

El procedimiento de acuerdo con la invención se basa en la determinación de componentes inducibles por células T, tales como moléculas de ARN o proteínas, cuya producción en CPA se module de forma medible tras un contacto específico de antígeno con una célula T activada, es decir, se aumente, se reduzca o se modifique.

La determinación de procesos de maduración inducidos por células T en CPA o cultivos que contienen CPA tiene lugar con métodos conocidos hasta el momento mediante la determinación de marcadores en forma de proteínas en cultivos de células estimuladas específicamente con vectores de expresión con el uso de distintos procedimientos de detección de proteínas, tales como FACS, ELISpot o ELISA. Estos procedimientos se ha comprobado que son solo limitados o no adecuados sin embargo para una determinación fiable de células T activadas para aplicaciones de diagnóstico.

Se sabe que las moléculas marcadoras inducibles por células T se producen en una pluralidad de diferentes enfermedades e infecciones microbianas en diferentes poblaciones de células, mediante lo cual los sujetos de ensayo o pacientes que van a examinarse presentan individualmente una expresión de base a veces muy variable y en parte ya muy alta de estas proteínas marcadoras. Además, las CPA incluyen con frecuencia ya mayores cantidades de moléculas marcadoras preformadas, es decir ya expresadas, que están presentes independientemente de una estimulación específica de antígeno mediante una célula T auxiliar activada. Además, una célula T auxiliar activada estimula habitualmente solo una o solo algunas CPA, pudiendo conseguirse a nivel celular solo un aumento de sensibilidad limitado. Debido a estas circunstancias conocidas se partió hasta el momento de que no sea posible una determinación fiable de células T activadas mediante la detección de marcadores específicos a nivel de proteínas en CPA estimuladas por las células T activadas en una medida fiable desde el punto de vista del diagnóstico.

Sorprendentemente pudo mostrarse que el procedimiento de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo mediante la determinación de la producción inducida por células T de por ejemplo moléculas de ARNm como marcador en CPA. Debido a las dificultades mencionadas anteriormente en cuanto a la expresión variable de determinadas moléculas marcadoras ha de considerarse inesperado que la detección de acuerdo con la invención de un marcador de las CPA a nivel de ARN permite una determinación fiable y sensible de células T activadas específicas de antígeno. Así, el contacto de una célula T activada con una CPA induce la producción de una cantidad muy alta de moléculas de ARNm, lo que lleva a una fuerte amplificación del marcador y por lo tanto a una sensibilidad claramente aumentada del procedimiento de acuerdo con la invención.

Existían hasta el momento sin embargo prejuicios técnicos fundamentales frente al uso de marcadores inducibles por células T, tales como la producción de moléculas de ARNm, en CPA como detección de células T específicas de antígeno activadas como marcadores para procesos patológicos activos. Estos prejuicios técnicos se basan en particular en el hecho de que los marcadores específicos en las CPA presentan individualmente una expresión de base muy variable. Una compensación de estas variaciones es sin embargo obligatoriamente necesaria para una definición de valores umbral fiables para un resultado de ensayo predictivo.

Estos prejuicios técnicos se superaron en el procedimiento de acuerdo con la invención en particular mediante la determinación del aumento relativo de la expresión de marcador mediante la detección del marcador de las CPA en una primera alícuota estimulada con al menos un antígeno y una segunda alícuota no estimulada de un fluido corporal de un individuo y la determinación de la relación de la primera alícuota y de la segunda alícuota.

En una forma de realización preferida de la invención está previsto un procedimiento, en el que en la etapa c) se detecta adicionalmente al menos un segundo marcador en la primera y en la segunda alícuota, siendo el segundo

marcador un marcador inducido de las células T en sí, y etapa d) comprende la detección y la cuantificación de las poblaciones de células T determinando la relación del primer marcador detectado de las CPA y del segundo marcador de la célula T de la primera alícuota con respecto a la segunda alícuota.

5 De acuerdo con la invención, mediante este procedimiento está previsto que sea posible una diferenciación entre células T vírgenes, células T activadas y células T de memoria como poblaciones de células T individuales. En este sentido, este procedimiento de acuerdo con la invención ofrece la posibilidad para un diagnóstico diferencial en determinadas enfermedades. De este modo, es posible entre otras cosas en el caso de una enfermedad por tuberculosis, en forma de un diagnóstico diferencial de este tipo diferencial pacientes con una enfermedad activa y  
 10 una necesidad de tratamiento concreta adjunta de pacientes con una infección latente, en los que no existe ninguna necesidad de tratamiento concreta, e individuos sanos. Este diagnóstico diferencial se permite mediante la detección de un primer y un segundo marcador. El primer marcador representa en este sentido el marcador inducido por células T de las CPA. Este marcador se induce solo en procesos patológicos activos. El segundo marcador es un marcador de la célula T en sí. Este segundo marcador se forma en presencia de células T activadas y de memoria  
 15 en la preparación de procedimiento.

En una forma de realización preferida adicional de la invención está previsto un procedimiento, en el que el procedimiento comprende en la etapa a) una etapa adicional a') poner en contacto la segunda alícuota con al menos un antígeno, y en la etapa b) una etapa adicional b') incubar la segunda alícuota con el antígeno a lo largo de un  
 20 periodo de tiempo determinado, diferenciándose el periodo de tiempo en la etapa b') del periodo de tiempo en la etapa b), y en lugar de la etapa c) una etapa c') detectar y diferenciar las poblaciones de células T mediante detección del primer marcador en la primera y segunda alícuota mediante RT-qPCR, y etapa d).

En una forma de realización especialmente preferida de la invención está previsto que el periodo de tiempo de la incubación en la etapa b') ascienda a 0 minutos. En una forma de realización preferida adicional de la invención el periodo de tiempo asciende de 0 a 60 minutos, más preferentemente de 0 a 45 minutos, más preferentemente de 0 a 30 minutos, más preferentemente de 0 a 20 minutos, más preferentemente de 0 a 15 minutos, más preferentemente de 0 a 10 minutos, en particular preferentemente de 0 a 5 minutos. De acuerdo con la invención está previsto que la segunda alícuota se ponga en contacto durante un periodo de tiempo claramente más corto en comparación con el  
 30 periodo de tiempo de la incubación de la primera alícuota hasta una denominada "muestra cero", como para una duración de 0 minutos, con el antígeno. Por lo tanto está previsto que en el plazo del periodo de tiempo de la incubación de la segunda alícuota no se ha formado aún ningún marcador o solo están presentes cantidades muy bajas del marcador hasta entonces. En particular de acuerdo con la invención está previsto que el periodo de tiempo en la etapa b') es claramente más corto que el periodo de tiempo en la etapa b). De acuerdo con la invención tiene lugar por lo tanto la incubación de la segunda alícuota con el antígeno en la etapa b') solo en un intervalo de algunos segundos a un periodo de tiempo que dura hasta 0 minutos o al menos no a lo largo de un periodo de tiempo más largo.

En una forma de realización preferida adicional de la invención está previsto que la segunda alícuota se ponga en contacto con un antígeno irrelevante en la etapa a') y se incuba en la etapa b'). De acuerdo con la invención, por un antígeno irrelevante se entiende un antígeno para el que el individuo no tenga ninguna célula T activada o célula T de memoria. Un antígeno irrelevante de este tipo puede ser por ejemplo albúmina o en personas VIH seronegativas una proteína de VIH.

45 En una forma de realización preferida de la invención está previsto un procedimiento, en el que la etapa c') comprende la detección y la diferenciación de las poblaciones de células T mediante la detección del primer y del segundo marcador.

En una forma de realización preferida adicional de la invención está previsto un procedimiento, en el que la alícuota del fluido corporal se separa en una alícuota A que contiene solo CPA y en una alícuota B que contiene células T, y en el que la etapa a) comprende una etapa a1) poner en contacto la alícuota A con al menos un antígeno, y una etapa posterior a2) poner en contacto la alícuota A puesta en contacto con el al menos un antígeno con la alícuota B.

55 De acuerdo con la invención está previsto por lo tanto que las CPA se carguen en primer lugar con el antígeno antes de que añadan las células T. De acuerdo con la invención está previsto más preferentemente que la alícuota B que contiene células T también contenga CPA no cargadas, es decir CPA sin contacto de antígeno previo.

De acuerdo con la invención está previsto que las poblaciones de células T contengan células T vírgenes, células T activadas o células T de memoria.

60 En una forma de realización preferida de la invención está previsto que las células T de la población de células T sean células T CD4<sup>+</sup>, en particular células Th-1, células Th-2, células Th-17, células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, células Th-3, células T CD8<sup>+</sup>, en particular células T citotóxicas CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, células NKT CD161<sup>+</sup> y/o una mezcla de distintas células T.

De acuerdo con la invención preferentemente está previsto además que el fluido corporal sea sangre, líquido cefalorraquídeo, linfa, líquido pericárdico, un lavado bronquial, una punción de médula ósea, una suspensión de tejido linfático o una población de PBMC purificada.

5 En el contexto de la presente invención por "tejido linfático" se entienden linfocitos, bazo, amígdalas así como el tejido linfático de la mucosa gastrointestinal, tal como placas de Peyer, el tejido linfático de los órganos respiratorios y las vías urinarias.

10 En una forma de realización preferida adicional de la invención está previsto que el fluido corporal contenga adicionalmente una población de CPA separada. Además, de acuerdo con la invención se prefiere una denominada capa leucocítica (*buffy-coat*) como fluido corporal.

15 En una forma de realización preferida adicional de la invención está previsto que el antígeno sea un péptido, oligopéptido, un polipéptido, una proteína, un ARN o un ADN.

En una forma de realización preferida adicional el antígeno es un plásmido de expresión.

20 De acuerdo con la invención preferentemente además, el antígeno es un fragmento, un producto de escisión o un fragmento de un oligopéptido, de un polipéptido, de una proteína de un ARN o de un ADN.

De acuerdo con la invención preferentemente está previsto que el antígeno sea un antígeno de una bacteria, virus, planta, animal, hongo o parásito.

25 En una forma de realización preferida adicional de la invención está previsto que el antígeno sea un polipéptido del citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (VEB), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), parvovirus B 19, virus de varicela-zóster (VZV), virus vacuna, adenovirus, virus JC y BK, virus de la gripe tipo A, B, C, *Mycobacterium tuberculosis*, borrelia, *Toxoplasma gondii* o aspergilos o también un tumor o autoantígeno.

30 De acuerdo con la invención preferentemente el antígeno es un antígeno de virus con propiedades patógenas humanas. A continuación se describen ejemplos de acuerdo con la invención para virus de este tipo.

35 Esta enumeración no ha de entenderse en el contexto de la presente invención como limitativa, sino únicamente a modo de ejemplo. Los virus de la polio, virus Coxsackie, echovirus, enterovirus, rinovirus, ortomixovirus, en particular virus de la gripe de tipo A, B, C, paramixovirus, en particular virus parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio (virus RS), coronavirus, flavivirus, en particular virus de la fiebre amarilla, virus del Dengue, virus de la encefalitis japonesa B, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (FSME), el virus de la hepatitis C (HCV), togavirus, en particular alfa- y rubivirus, bunyavirus, en particular los bunyavirus, hantavirus, nairovirus, flebovirus y tospovirus, generavirus, virus de la rubeola, virus de la rabia, arenavirus, en particular el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV) y el virus de la fiebre de Lassa, virus de virus de la gastroenteritis, en particular rotavirus, adenovirus, calicivirus, astrovirus, coronavirus, retrovirus, en particular retrovirus de tipo A, B, C y D, lentivirus, en particular los virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y 2 (VIH-2), el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS), virus de la inmunodeficiencia en felinos (VIF), virus de la inmunodeficiencia en bovinos (BIV), espumavirus, los virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) y 2 (HTLV-2), parvovirus, en particular parvovirus B19 y virus adeno-asociados (VAA), papovavirus, en particular virus de papiloma, el virus de la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), virus BK, adenovirus, virus del herpes, en particular el virus de herpes simple tipo 1 (VHS-1) y 2 (VHS-2), el virus de varicela-zóster (VZV), citomegalovirus (CMV) y virus de Epstein-Barr (VEB), los virus del herpes humanos 6, 7 y 8 (VHH 6, 7 y 8), virus de la hepatitis, en particular el virus de la hepatitis A (VHA), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis D (VHD), virus de la hepatitis E (HEV) y virus de la hepatitis G (VHG) así como virus transmitido por transfusión (VTT) y virus de la viruela, en particular virus de la viruela orto, tales como el virus de la viruela humana, virus vaccinia, virus de la viruela vacuna y virus parapox. Además, los polipéptidos de agentes patógenos virales de enfermedades raras, subagudas o crónicas, pueden proceder en particular de virus de Marburgo y virus del Ébola, así como bornavirus.

55 De acuerdo con la invención de manera especialmente preferente, el antígeno es un polipéptido del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), por ejemplo gp120, gp160, p17, p24, Pr55<sup>gag</sup>, polimerasa (Pol), transcriptasa inversa (RT) y nef.

60 Además de acuerdo con la invención de manera especialmente preferente el antígeno es un polipéptido del virus de Epstein-Barr (VEB), tal como EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B (EBNA4), EBNA3C (EBNA-6) BZLF1, BMLF1, BMRF1, BHRF1, BARF0, BRLF1, B'EF4, gp85, gp110, gp220/350, p150 de VCA, EBNA-LB, LMP1 y LMP2 (por ejemplo recopilado en Khanna et al. (2000), Annu. Rev. Microbiol. 54:19-48).

65 De acuerdo con la invención de manera especialmente preferente además el antígeno es un polipéptido del citomegalovirus (CMV), tal como UL123 (IE1), UL122 (IE-2), UL83 (pp65), UL82, HL99, UL28, UL33, UL37, US3, UL94, UL16, UL55(gB), UL85, UL25, US18, UL45 y UL32 (pp150) (por ejemplo recopilado en Crough et al. (2009)

Clin Microbiol Rev. 22:76-98).

Además de acuerdo con la invención de manera especialmente preferente el antígeno es un polipéptido del virus varicela-zóster (VZV), tal como ORF1, ORF4, ORF10, ORF14, ORF29, ORF62 y ORF68 (gE).

De acuerdo con la invención de manera especialmente preferente además el antígeno es un polipéptido del virus de la hepatitis B, tal como HBsAg y HBcAg.

Además de acuerdo con la invención de manera especialmente preferente el antígeno es un polipéptido de adenovirus, tal como la proteína de hexón AdV5.

De acuerdo con la invención además preferentemente el antígeno es un antígeno de virus patógenos animales, que se enumeran a continuación. Esta enumeración no ha de interpretarse en el contexto de la presente invención como limitante, sino únicamente a modo de ejemplo. El morbillivirus equino (EMP), picornavirus, en particular enterovirus, aptovirus con el gen patógeno de la fiebre aftosa (MKS), el virus de la estomatosis vesicular, paramixovirus, en particular morbillivirus, paramixovirus aviares, virus de la viruela, en particular capripoxvirus, bunyavirus, reovirus, en particular orbivirus, flavivirus, en particular pestivirus, ortomoxovirus, en particular el virus de la gripe A, virus del herpes, en particular virus del herpes alfa, virus de la rabia, retrovirus, en particular lentivirus y retrovirus de tipo C, togavirus, rabdovirus, birnavirus, coronavirus y calicivirus.

Una amplia enumeración de los virus descritos actualmente se recopiló por ejemplo por el comité internacional de taxonomía de los virus (*The International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV)) y puede consultarse a través de internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&name=Viruses&lvl=3&srchmode=1&keep=1&unlock>).

De acuerdo con la invención además preferentemente el antígeno es un antígeno de bacterias. En particular de acuerdo con la invención se prefieren antígenos de bacterias patógenas humanas. A continuación se describen ejemplos de acuerdo con la invención para bacterias de este tipo. Esta enumeración no puede considerarse como limitante en el contexto de la presente invención, sino únicamente a modo de ejemplo. Estafilococos, estreptococos, enterococos, neiserias, enterobacterias, en particular *Escherichia coli* (*E. coli*), inclusive cepas de *E. coli* patógenas de mamíferos (EPEC), cepas de *E. coli* enteroagregativas (EAggEC), kliebsiellas, enterobacteria, Serratia, Proteus, citrobacteria y salmonelas tifoideas, salmonelas de enteritis, Shigellas, Yersinias, Vibriomas, en particular *Vibrio cholerae* y *Vibrio El Tor*, pseudomonas, Burkholderia, Stenotrophomas, Acinetobacter, Campilobacter, Helicobacter, en particular *Helicobacter pilori*, hemofilus, Bordetellas, Legionellas, Listerias, Brucellas, Francisellas, Erysipelothrix, Korynebacterias, Bacillus, Clostridios, Bacterioide, Prevotella, Porphyromonas, Fusobacteria, Anaerobiospirillum, Anaerorhabdus, Anaerovibrio, Butyrivibrio, Centripedia, Desulfomonas, Dichelobacter, Fibrobacter, Leprotricha, Megamonas, Mitsuoella, Rikenella, Sebaldeia, Selenomonas, Succinovibrio, Succinimonas, Tisserella, Mycobacterias, en particular *M. tuberculosis*, micobacterias típicas (MOTT) y *M. leprae*, Nocardias, Treponemas, en particular *T. pallidum* y *T. carateum*, Borrelias, en particular *B. burgdorferi sensu lato*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitanae* y *B. spielmanii*A14S y *B. recurrentis*, Leptospiras, Ricksetsias, Coxiellas, Ehrlichias, Bartonellas, Mycoplasmas, en particular *M. pneumoniae* y *M. hominis*, Ureaplasmas, Actinomycetos, clamidias. De acuerdo con la invención además preferentemente los antígenos pueden proceder de bacterias médicamente significativas, tal como por ejemplo Tropheryma, Pasteurella, Branhamella, Streptobacillus, Spirillum y Gardnerella.

De acuerdo con la invención de manera especialmente preferente además el antígeno es un polipéptido de *M. tuberculosis*, tal como CFP-10, ESAT-6, TB7.7, TB37.6 y MPT63 o una mezcla de polipéptido, tal como por ejemplo tuberculina PPD.

Además de acuerdo con la invención de manera especialmente preferente el antígeno es un polipéptido de *Borrelia spec*, tal como VlsE, p58 (OppA-2), BBK32, p14, p20 (BBQ03), p21-24 (OspC), p37-38 (FlaA), p41 (Flagellin, FlaB), p19 (OspE), p18, Crasp3, BBA36, BB0323, p26 (OspF), p28 (OspD), p30, p39, (BmpA), p60-65 (antígeno común, Hsp60), p83-100, p17 (Osp17), p31-32 (OspA) y p34 (Osp B) o lípidos de *Borrelia* o un lisado de cepas de *borrelia*.

En una forma de realización preferida adicional de la invención el antígeno es un antígeno de bacterias patógenas animales. A continuación se describen ejemplos de acuerdo con la invención para bacterias de este tipo. Esta enumeración no ha de considerarse como limitativo en el contexto de la presente invención, sino únicamente a modo de ejemplo. Micoplasmas, Bacillus, en particular *Bacillus anthracis*, brucelas, micobacterias, en particular *M. tuberculosis* y *M. bovis*, Campilobacter, Tritrichomonas, Leptospiras, Ricksetsias, salmonelas, clostridios, actinobacilus, clamidias, equinococos, listerias, yersinias, corinebacterias y Francisella. Una amplia lista de las bacterias descritas en este momento puede consultarse a través de internet en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>.

En una forma de realización adicional de la invención, el antígeno es un antígeno de un hongo. En una forma de realización preferida de la invención, el antígeno procede de un hongo patógeno humano. A continuación se describen ejemplos de acuerdo con la invención para hongos de este tipo. Esta lista no ha de considerarse como limitante en el contexto de la presente invención, sino únicamente a modo de ejemplo. Los sacaromicetos, en

particular cándida, criptococos, malassetia, hongos filamentosos, en particular Aspergillus, Trichophyton, Microsporum, y Epidermophyton, hongos dimorfos, en particular histoplasma, Blastomyces, Coccidioides, Paracoccidioides, Sporothrix y Pneumocystis.

5 En una forma de realización adicional de la invención el antígeno es un antígeno de un parásito. En una forma de realización preferida de la invención el antígeno procede de un parásito patógeno humano. A continuación se describen ejemplos de acuerdo con la invención para parásitos de este tipo. Esta lista no ha de interpretarse como limitante en el contexto de la presente invención, sino únicamente a modo de ejemplo. Protozoos, tales como tripanosomas, leishmanias, tricomonas, Giardia, amebas, plasmodios, toxoplasma, criptosporidios, microsporidios.  
10 Trematodos, tales como Schistosomas, así como cestodos, tales como tenias y equinococos, así como nematodos, tales como Trichuris, Trichinella, Strongiloides, Anciclostoma, Necator, Enterobius, Ascaris y Filarien. En una forma de realización preferida adicional de la invención el antígeno es un polipéptido de parásitos patógenos animales. A continuación se describen ejemplos de acuerdo con la invención para parásitos patógenos animales de este tipo. Esta lista no ha de interpretarse como limitante en el contexto de la presente invención, sino únicamente a modo de ejemplo. Protozoos, en particular protomonadas, diplomonadas, polimastigidos, amebas, toxoplasmas y coccidios,  
15 microsporas, helmintos, trematodos, cestodos y nematodos.

En una forma de realización preferida adicional de la invención está previsto que el antígeno sea un antígeno tumoral o un autoantígeno. En relación con la presente invención por un "autoantígeno" se entiende un antígeno que presenta estructuras en forma de fragmentos peptídicos, que representan estructuras propias del organismo. En casos en los que están presentes células T, que presentan una reactividad frente a autoantígenos de este tipo, es posible la presencia de una enfermedad autoinmunitaria. Los autoantígenos se designan también como antígenos propios o antígenos autoinmunitarios.

25 En el contexto de la presente invención está previsto que mediante la incubación con un antígeno asociado a tumor o autoinmunitario puedan detectarse células T activadas, que indican una enfermedad tumoral o una enfermedad autoinmunitaria.

En una forma de realización preferida de la presente invención el antígeno es un antígeno tumoral humano. De acuerdo con la invención preferentemente el antígeno específico de la próstata (PSA), es HER-2/neu, mucina-1, p53 de tipo natural sobreexpresado así como p53 que presenta mutaciones puntuales, antígeno MAGE y CEA (antígeno carcino-embriionario).

35 En una forma de realización preferida adicional el antígeno es un antígeno autoinmunitario. De acuerdo con la invención se prefiere un antígeno autoinmunitario para esclerosis múltiple (EM), tal como la proteína básica de mielina (PBM), la glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG), la proteína proteolípida de la mielina (PLP), mielina, la proteína de fusión PBM/PLP (MP4), la proteína básica asociada a la mielina sobre oligodendrocitos (MOBP), la proteína específica de oligodendrocitos (OSP), la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) pero también la glicoproteína P0, la proteína de mielina periférica 22 (PMP-22/PAS-II), la p170k/SAG (glicoproteína de membrana celular de Schwann), la glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (OMgp), la proteína de la mielina de células de Schwann (SMP), la transaldolasa, S100β, alfa B cristalina, 2', 3'-nucleótido cíclico 3' fosfodiesterasa (CNP), el factor neurótrofo ciliar (CNF) y la proteína de fibras glial ácida (GFAP).

45 De acuerdo con la invención se prefiere más un antígeno autoinmunitario para diabetes tipo 1 (diabetes mellitus juvenil), tal como insulina B, pre-pro-insulina (PPI), la tirosina fosfatasa IA-2, el ácido glutámico descarboxilasa 65 (GAD65), la proteína de choque térmico Hsp60, la proteína de células de islote ICA69, IGRP, cd4, cromogranina A (ChgA) (véase también Velthuis et al. (2010) Diabetes).

50 En una forma de realización especialmente preferida de la invención el antígeno se selecciona del grupo que consiste en PSA, HER-2/neu, mucina-1, MAGE, CEA, proteína básica de la mielina (PBM), glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG), proteína proteolípida de la mielina (PLP), mielina, insulina B, Pre-Pro-insulina, IA-2, GAD65, Hsp60, ESAT-6, CFP-10, TB7.7, TB37.6, MPT63, tuberculina PPD, p14, OspC, p37-38 (FlaA), p41, OspE, OspF, OspD, p39, Osp17, OspA, OSP B, Pr55<sup>gag</sup>, p24, p17, POL, RT, nef, pp65, IE1, IE2, BZLF1, EBNA3, EBNA2, EBNA6, BMLF1, EBNA1, ORF1, ORF4, PRF62, ORF68, HBsAg, HBcAg y AdV5.

55 En una forma de realización preferida adicional de la invención el antígeno se selecciona de polipéptidos, que incluyen epítopos de células T auxiliares.

60 En una forma de realización preferida adicional de la invención está previsto que el periodo de tiempo de la puesta en contacto en la etapa a) y de la incubación en la etapa b) ascienda a de 0 horas a 72 horas, preferentemente 4, 6 u 8 horas. Además preferentemente está previsto que el periodo de tiempo en la etapa a) y/o etapa b) ascienda a de 0 horas a 72 horas, preferentemente 4, 6 u 8 horas. Además de acuerdo con la invención se prefiere el periodo de tiempo en la etapa a) y/o etapa b) un periodo de tiempo de 0 a 48 horas, más preferentemente de 0 a 36 horas, más preferentemente de 0 a 34 horas, más preferentemente de 0 a 32 horas, más preferentemente de 0 a 30 horas, más  
65 preferentemente de 0 a 28 horas, más preferentemente de 0 a 26 horas, más preferentemente de 0 a 24 horas, más preferentemente de 0 a 22 horas, más preferentemente de 0 a 20 horas, más preferentemente de 0 a 18 horas, más



preferentemente de 0 a 16 horas, más preferentemente de 0 a 15 horas, más preferentemente de 0 a 14 horas, más preferentemente de 0 a 12 horas, más preferentemente de 0 a 10 horas, más preferentemente de 0 a 9 horas, más preferentemente de 0 a 8 horas, más preferentemente de 0 a 7 horas, más preferentemente de 0 a 6 horas, más preferentemente de 0 a 5 horas, más preferentemente de 0 a 4 horas, más preferentemente de 0 a 3 horas, más preferentemente de 0 a 2 horas y más preferentemente de 0 a 1 hora. En una forma de realización preferida adicional de la invención el periodo de tiempo en la etapa a) y/o etapa b) asciende a de 0 a 60 minutos, más preferentemente de 0 a 50 minutos, más preferentemente de 0 a 40 minutos, más preferentemente de 0 a 30 minutos, más preferentemente de 0 a 20 minutos, más preferentemente de 0 a 15 minutos, más preferentemente de 0 a 10 minutos y más preferentemente de 0 a 5 minutos.

De acuerdo con la invención además preferentemente está previsto que el primer marcador de las CPA y el segundo marcador de las célula T es un ácido nucleico, en particular un ARN, un ADN, o un fragmento de ácido nucleico, y se induce mediante la puesta en contacto y la incubación con el al menos un antígeno.

En una forma de realización preferida adicional de la invención está previsto que el marcador de las CPA es ligando 4-1BB (4-1BBL), ligando OX40 (OX40L), TNFSF (CD70), B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), Fc $\gamma$ RIII (CD16), Fc $\gamma$ RII (CD32), Fc $\gamma$ RI (CD64) o un representante adicional de la superfamilia de TNF/receptor de TNF y/o de las inmunoglobulinas o un miembro de la familia de CXCL por ejemplo CXCL9, CXCL10, CXCL11 o un miembro de la familia de ligandos de quimiocinas (motivo C-C) por ejemplo CCL2, CCL 7, CCL8, CCL10 o IL1RN.

En una forma de realización preferida adicional de la invención está previsto que el marcador de las células T es IFN- $\beta$ , INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, TGF- $\beta$ , M1P1a, MIP1b, 4-1BB, CD25, perforina y/o granzima. De acuerdo con la invención además está previsto el marcador de las células T sea una citocina o quimiocina adicional producida a partir de células T activadas o células T de memoria reactivadas.

De acuerdo con la invención se prefieren como marcador en particular ácidos nucleicos, que se aumentan de manera medible naturalmente tras un reconocimiento específico de epítipo de una CPA mediante una célula T en su producción en la CPA. Ejemplos de ácidos nucleicos de este tipo como marcadores de acuerdo con la invención de las CPA son las moléculas de ARNm del ligando 4-1BB (4-1BBL) y del ligando OX40 (OX40L) (Oshima et al. 1997, J. Immunol. 159, 3838-3848; den Haan and Bevan; 2000, PNAS 97, 12950-12952). Además de acuerdo con la invención se prefieren moléculas de ARNm de las proteínas coestimuladoras B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) y del ligando de Fas (FasL), así como otras proteínas de la familia de TNF/receptores de TNF y la superfamilia de las inmunoglobulinas, así como distintos receptores de Fc así como moléculas de ARNm de citocinas y quimiocinas. De acuerdo con la invención se prefieren además los ácidos nucleicos de cualquier polipéptido, cuya producción, a consecuencia del reconocimiento específico de un polipéptido presentado junto con proteínas de MHC sobre la superficie de CPA se aumenta o reduce de forma medible mediante una célula T activada en las mismas CPA.

En una forma de realización preferida adicional de la invención está previsto que la detección y la cuantificación en la etapa c) y d) se lleve a cabo adicionalmente mediante PCR, PCR cuantitativa (qPCR), micromatriz, FACS, ELISpot y/o ELISA.

En este caso se describe un kit para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención que comprende al menos un antígeno y un par de cebadores para la amplificación del primer marcador.

Así mismo se describe que el kit contiene además un par de cebadores para la amplificación del segundo marcador. Además se describe que el kit contiene además un par de cebadores para la amplificación del gen de referencia. Además se describe que el kit contiene adicionalmente sondas así como un medio de cultivo celular.

Además se describe que el kit comprende adicionalmente reactivos de estabilización de ARN, una matriz madre de RT, una matriz madre de qPCR, un control positivo y un reactivo positivo. Por un "control positivo" se entiende una cantidad definida del ADN de marcador que va a amplificarse. Por un "reactivo positivo" se entiende un reactivo que estimula de manera no específica el marcador de las CPA también en ausencia de la célula T activada. Ejemplos de un "reactivo positivo" son PMA/ionomicina o un anticuerpo anti-CD40 de activación en combinación con prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>).

Se describe que el kit contiene además cebadores que permiten una detección del marcador de las CPA mediante PCR, qPCR o micromatriz.

A continuación se explica la invención mediante los siguientes ejemplos. Estos ejemplos han de considerarse como una forma de realización especial de la invención y no interpretarse como limitantes.

**Ejemplo 1:** Inducción específica de la producción de ARNm del ligando 4-1BB en cocultivos de PBMC cargados con proteína ESAT-6/CFP-10 y células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas y expandidas *ex vivo*

Para establecer el procedimiento para la detección, diferenciación y para la cuantificación de poblaciones de células T determinadas, tales como células T activadas se examinaron procesos de maduración inducidos por células T en células presentadores de antígenos (CPA). Para ello se desarrolló un modelo de cultivo celular, que se basa en el cocultivo de CPA cargadas con antígeno con células T auxiliares específicas de antígeno activadas, expandidas *ex vivo*. En este sistema de modelo sirvieron cocultivos (i) de CPA no cargadas o cargadas con un antígeno irrelevante con células T auxiliares específicas de antígeno preactivadas y (ii) de CPA cargadas con antígeno con células T activadas de manera no específica o células T auxiliares activadas con una especificidad para un antígeno irrelevante como controles negativos. La detección de células T auxiliares específicas de antígeno (células Th) tiene lugar en este sistema mediante la cuantificación comparable la producción de ARNm de marcador en preparaciones de cultivo no estimuladas y estimuladas de manera no específica por medio de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa con transcripción inversa (RTqPCR).

a) Expansión *ex vivo* de células Th específicas de antígeno

Para la generación de células Th activadas específicas de ESAT-6/CFP-10 se expandieron células T CD4<sup>+</sup> de donantes con una infección latente por *Mycobacterium tuberculosis* a lo largo de 3-4 semanas *in vitro*. Para ello se extrajo la sangre de los sujetos de ensayo en una jeringa heparinizada, se diluyó con PBS<sub>sin</sub> (solución salina tamponada con fosfato sin iones divalentes; Lonza) y a continuación se separaron las células sanguíneas a través de un gradiente de centrifugación por densidad con el uso de Pancoll (Pan Biotech) durante 30 min a 20 °C y 800 x g de su densidad de manera correspondiente. A continuación se aislaron las PBMC a partir del gradiente y se lavaron dos veces con PBS<sub>sin</sub> durante 10 min a 300 x g. A continuación se aislaron las células T CD4<sup>+</sup> con el uso de la tecnología MACS (kit de aislamiento de células T CD4<sup>+</sup> II, Miltenyi) y se cultivaron mediante estimulación semanal con una proteína de fusión ESAT-6/CFP-10 (AG Lindner, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg), CPA autólogas (células dendríticas maduras, PBMC) en una relación de 1:3 (células Th:CPA) en medio R5 completo (RPMI 1640 (PAN Biotech), 5 % de suero AB humano (producido a partir de la sangre de donantes con el grupo sanguíneo AB), 1 % de penicilina/estreptavidina (PAN Biotech)). Las CPA se cargaron para ello con 10 µg/ml de la proteína de fusión ESAT-6/CFP-10 en una concentración de 1X10<sup>7</sup> células/ml en medio R5 completo durante 3 horas (h) a 37 °C en atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5 % y antes del precultivo con las células Th aisladas se sometieron a una radiación y de 30 Gy. Para una proliferación óptima de las células Th se mezclaron los cultivos con 50 U/ml de IL-2 recombinante (proleucina S, Novartis). La proliferación de las células Th se determinó semanalmente mediante la determinación del número de células total de células vitales con el uso de un hemocitómetro. La especificidad del cultivo se determinó así mismo semanalmente mediante la determinación del número de células T positivas para IFN-γ y CD40L tras estimulación con PBMC cargadas con ESAT-6/CFP-10 irradiadas. Para ello se incubaron las células Th del cultivo de expansión en una relación de 1:1 con PBMC autólogas recién aisladas durante 6 h a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % en presencia de ESAT-6/CFP-10 10 µg/ml. Después de una incubación de dos horas se agregó brefeldina A para impedir la liberación de citocinas de las células. Con, respectivamente, 1 µg/ml de muestras no estimuladas o estimuladas con PMA/ionomicina sirvieron como controles positivos y controles negativos. A cada preparación de estimulación se agregaron anticuerpos anti-CD49d y anti-CD28 coestimuladores 1 µg/ml. A la incubación le siguió una única etapa de lavado. Para ello se mezclaron las células con 9 ml de PBS<sub>sin</sub> y se centrifugó a 4 °C y 300 x g durante 8 minutos. El sobrenadante se desechó y se resuspendieron las células en reflujó. A continuación se marcaron moléculas de superficie con respectivamente 5 µl de los siguientes anticuerpos conjugados con fluoróforo: alofococianina-H7 anti-CD3 (BD), alofococianina anti-CD4 (BD), proteína peridrina clorofila anti-CD8 (BD). La tinción de superficie se llevó a cabo durante 20 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Después se lavaron las células y se fijaron con 500 µl de paraformaldehído al 2 % (PFA) (Sigma Aldrich) en PBS<sub>sin</sub> durante 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de un proceso de lavado adicional se llevó a cabo en presencia de 10 µl de saponina al 2 % (Carl Roth) en PBS<sub>sin</sub> para la permeabilización de las células la tinción del IFN-γ intracelular así como del CD40L intracelular con el uso de 1 µl de fluorescein isotiocianato anti-IFN-γ (BD) y 10 µl de R-ficoeritrina anti-CD40L (BD) 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación se lavaron las células dos veces con 0,1 % de saponina en PBS<sub>sin</sub> y se llevó a 300 µl de PFA al 1 % en PBS<sub>sin</sub>. Las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo FACS CANTO II (BD). Para ello se separaron en primer lugar poblaciones celulares según la luz dispersa hacia delante y luz dispersa hacia los lados. La población de linfocitos se examinó a continuación en cuanto a la expresión de CD3. Todas las células CD3<sup>+</sup> se analizaron a continuación con respecto a la expresión de la proteína CD4 y CD8. Las células T CD4<sup>+</sup> se examinaron entonces con respecto a la expresión de IFN-γ y CD40L.

En este sentido se determinó de porcentaje de células T auxiliares específicas de ESAT-6/CFP-10 activadas por medio de la expresión de IFN-γ y CD40L (datos no representados). En los cultivos de expansión pudo observarse una proliferación continua de células T auxiliares, que iba acompañada del aumento de células Th específicas de ESAT-6/CFP-10. Después de 3-4 semanas pudieron generarse por lo tanto del 5 al 18 % de células Th específicas en los cultivos de expansión. La generación y caracterización de células Th específicas de VEB (BZLF1) y CMV (pp65) tuvo lugar con el uso de muestras de sangre de donantes VEB o CMV seropositivos, de manera correspondiente al protocolo de ensayo descrito anteriormente.

b) Cocultivo de células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas *ex vivo* con PBMC cargadas con proteína de fusión ESAT-6/CFP-10 autólogas recién preparadas

PBMC recién preparadas de donantes con tuberculosis latente se cocultivaron en presencia y en ausencia de proteína de fusión ESAT-6/CFP-10 10 µg/ml con células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas *ex vivo* del cultivo de expansión en medio de células B (medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) (Lonza), suero AB humano al 10 %, IL-4 6 ng/ml (Miltenyi Biotech), transferrina 50 ng/ml (Roche), insulina 5 µg/ml (Roche)) en una relación de 1:1 con un número de células total de 1X10<sup>6</sup> células/ml. Las células se incubaron durante 10 h a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %, extrayéndose en diferentes tiempos (por ejemplo tras 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8 y 10 h) muestras de en cada caso 2X10<sup>5</sup> células. Estas se separaron por centrifugación ininterrumpidamente, se desechó el sobrenadante y el sedimento se congeló de inmediato en nitrógeno líquido. Hasta el procesamiento adicional se almacenaron las muestras a -80 °C. Previamente se examinó en un cocultivo de PBMC recién preparadas con células Th preactivadas *ex vivo* autólogas en el transcurso temporal tras una estimulación con ESAT-6/CFP-10 la presencia del marcador de activación CD40L sobre la superficie de las células Th. Estos exámenes mostraron que las células Th reestimuladas *in vitro* de forma específica presentan una expresión transitoria del CD40L sobre su superficie, habiéndose podido observar tras un cocultivo de 6 horas con CPA cargadas con antígeno el número más alto de células que expresan CD40L (datos no mostrados).

c) Cuantificación del ARNm de 4-1BBL en PBMC por medio de la RT-qPCR como detección indirecta para células Th activadas específicas de antígeno

A partir de las muestras de células se aisló con el uso del kit de ARN total peqLab peq GOLD (peqLab) el ARN total. Las contaminaciones de ADN se eliminaron por medio del kit de digestión peqGOLD DNaseI (peqLab). El ARN total se eluyó en 60 µl de DEPC agua (1 l de agua destilada más 1 ml de pirocarbonato de dietilo (Sigma); incubación durante 1 h a 37 °C y posterior tratamiento en autoclave durante 15 min a 121 °C).

Para la transcripción inversa (RT-PCR) en ADNc se mezclaron 10 µl del ARN eluido con 10 µl de la mezcla madre de RT-PCR. La mezcla madre de RT-PCR contiene tampón A 50 mM (TaqMan 1000 RXN Gold con tampón A (Applied Biosystems), MgCl<sub>2</sub> 5 mM (TaqMan 1000 RXN Gold con tampón A (Applied Biosystems)), cebador de hexámero aleatorizado 2,5 mM (MWG Operons/Eurofins), dNTP 5 mM, transcriptasa inversa de MuLV 2,5 U/µl (Applied Biosystems), inhibidor de ARNasa 1 U/µl (Applied Biosystems) en DEPC agua. La transcripción inversa tuvo lugar durante 15 min a 23 °C, 5 min a 95 °C y 30 min a 42 °C y se llevó a cabo con el uso de un termociclador PTC-200 Peltier (MJ Research). A continuación se mezclaron 24 µl de mezcla madre de qPCR (tampón A 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 6,875 mM, cebador directo de 4-1BBL 0,308 µM GAGGGTCCCGAGCTTTTCG, biomers, representado en SEQ ID NO:1; cebador inverso de 4-1BBL 0,308 µM GCCCATCGATCAGCAGAAC, biomers, representado en SEQ ID NO:2; sonda de 4-1BBL 0,2525 µM FAM-CCACCAGCTGCGCAAACATGCTMR, TIB Molbiol, representada en SEQ ID NO:3; cebador directo de GAPDH 0,308 µM GAAGGTGAAGGTCCGGAGTC, biomers, representado en SEQ ID NO:4; cebador inverso de GAPDH 0,308 µM GTAAACCATGTAGTTGAGGTC, biomers, representado en SEQ ID NO:5; sonda de GAPDH 0,2525 µM YAK-TCATTGATGGCAACAATATCCACT-TMR, TIB Molbiol, representada en SEQ ID NO:6; TaqGold Polimerasa 0,003125 U/µl en DEPC agua con 6 µl del ADNc generado. El perfil de temperatura de la qPCR comprendía una etapa de 10 minutos a 95 °C y a continuación 50 ciclos que consistían en 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C y se llevó a cabo en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus Real (Applied Biosystems).

Las células THP-1, que producen de manera constitutiva ARNm de 4-1BBL, sirvieron como control positivo y referencia. Estas se trataron en la prueba de igual manera que las muestras. Tuvo lugar a continuación una cuantificación relativa del ARNm de 4-1BBL con ayuda de la glicerinaldehído-3-fosfato-deshidrogenasa igualmente amplificada previamente (GAPDH) como gen de referencia según la fórmula siguiente:

$$R = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

$$\Delta\Delta Cq = [(Cq \text{ 4-1BBL (S)} - Cq \text{ GAPDH (S)})] - [(Cq \text{ 4-1BBL (NK)} - Cq \text{ GAPDH (NK)})]$$

Los resultados están indicados como la relación de la producción de ARNm de marcador de la muestra estimulada y el control negativo asociado, que se normalizó previamente con GAPDH. De cada muestra se llevó a cabo una determinación triple.

Estos exámenes mostraron que las células Th preactivadas, específicas de ESAT-6/CFP-10 en cocultivos con PBMC cargadas con ESAT-6/CFP-10, autólogas, en comparación con PBMC no cargadas inducen una producción de ARNm de 4-1BBL aumentada medible (Figura 3).

**Ejemplo 2: Correlación de la inducción de la producción de ARNm de ligando 4-1BB en cocultivos de PBMC cargadas con proteína ESAT-6/CFP-10 con el número de células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 expandidas *ex vivo***

Se expandieron *ex vivo* células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 de sujetos de ensayo infectados de manera latente con *Mycobacterium tuberculosis* tal como se describe en el Ejemplo 1 en el punto a) y a continuación se cocultivaron con PBMC autólogas recién preparadas tal como se describe en el Ejemplo 1 en el punto b). A este respecto se valoró el número de células Th específicas de ESAT-6/CFP-10, que se cocultivaron con 1X10<sup>6</sup> PBMC,

en una serie de concentraciones semilogarítmicas (escalones de concentración: ninguno, 117, 370, 1170, 3700, 11700, 37000, 117000 células Th preactivadas por  $1 \times 10^6$  PBMC). Después de una incubación de 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8 y 10 horas se extrajeron  $2 \times 10^5$  células, se sedimentaron durante 5 min a 300 g y el sedimento se congeló de inmediato en nitrógeno líquido. Hasta el uso adicional se almacenaron las células a  $-80^\circ\text{C}$ . El ARN total se aisló según el protocolo en el Ejemplo 1 en c) y se analizó en la RT-qPCR en cuanto a la producción del ARNm de 4-1BBL.

En estos exámenes pudo observarse una clara correlación entre el número de células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas y la intensidad de señal del marcador (producción aumentada del ARNm de 4-1BBL) (Figura 4).

**Ejemplo 3: Inducción de la producción de ARNm de 4-1BBL así como de ARNm de IFN- $\gamma$  en cocultivos de PBMC no estimuladas y estimuladas con ESAT-6/CFP-10 y células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 de *M. tuberculosis* preactivadas *ex vivo* autólogas**

Células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 de sujetos de ensayo infectados de manera latente con *Mycobacterium tuberculosis* se expandieron *ex vivo* tal como se describe en el Ejemplo 1 en el punto a) y a continuación se cocultivaron con PBMC autólogas recién preparadas tal como se describe en el Ejemplo 1 en el punto b). A este respecto se cocultivaron 50000 células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas *ex vivo* con  $1 \times 10^6$  PBMC. Con separaciones de 2 horas se extrajeron en el periodo de tiempo entre 0 y 32 horas en cada caso  $2 \times 10^5$  células de la preparación de cultivo, se sedimentaron durante 5 min a 300 x g y el sedimento se congeló de inmediato en nitrógeno líquido. Hasta el uso adicional se almacenaron las células a  $-80^\circ\text{C}$ . El ARN total se aisló según el protocolo en el Ejemplo 1 en c) y se analizó en la RT-qPCR en cuanto a la producción del ARNm de 4-1BBL. Además se examinó igualmente tal como se describe en el Ejemplo 1 en c) la producción del ARNm de la citocina IFN- $\gamma$ , que tras el contacto específico de antígeno de CPA con células T específicas se reparten por las células T. Para ello se usó el siguiente sistema de cebador-sonda, usándose también en este caso GAPDH como gen de referencia: cebador directo de IFN- $\gamma$  GTGGAGACCATCAAGGAAGACAT, biomers, representado en SEQ ID NO:7; cebador inverso de IFN- $\gamma$  GGCGACAGTTCAGCCATCA, biomers, representado en SEQ ID NO:8; sonda de IFN- $\gamma$  FAMTTCATGTATTGCTTTGCGTTTGACATTCAA-TMR, representada en SEQ ID NO:9.

En el caso de personas infectadas de manera latente con *M. tuberculosis*, en la mezcla de PBMC están presentes células Th específicas de *M. tuberculosis*, que presentan en parte también una especificidad para ESAT-6/CFP-10. Las células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 activadas aparecen por el contrario de manera transitoria durante una enfermedad aguda y solo entonces pueden hallarse en la mezcla de PBMC. La valoración de las células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas *ex vivo* en PBMC imita una infección aguda por *M. tuberculosis*. Estos exámenes mostraron que en el cocultivo de células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas *ex vivo* con PBMC autólogas de un donante con tuberculosis latente además de la producción aumentada del ARNm de 4-1BBL también pudo detectarse un aumento relativo del ARNm de IFN- $\gamma$  (Figuras 5A y 5B).

**Ejemplo 4: Inducción de la producción de ARNm de 4-1BBL en cocultivos de PBMC cargadas con ESAT-6/CFP-10 con células Th activadas específicas de ESAT-6/CFP-10 o células Th activadas preactivadas de forma no específica**

Para examinar la especificidad de antígeno del procedimiento de RTT se estimularon PBMC de un donante con tuberculosis latente en presencia y ausencia de la proteína ESAT-6/CFP-10 con células Th activadas específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas o células Th activadas no específicas de ESAT-6/CFP-10 y se determinó en distintos tiempos el aumento relativo de la producción de 4-1BBL en cultivos celulares estimulados con ESAT-6/CFP-10 en comparación con cultivos celulares no estimulados por medio de la técnica de RT-qPCR. Para ello se aislaron células Th tal como se describe en el Ejemplo 1 en a) y se cultivaron las células Th obtenidas con perlas Expand de células T comercialmente disponibles (Dynabeads, Invitrogen) en una relación de 2:1 en medio R5 durante 14 días en una atmósfera húmeda a  $37^\circ\text{C}$  y  $\text{CO}_2$  al 5 %. La activación de las células T se determinó mediante citometría de flujo mediante la monitorización de la expresión del CD40L. Estos exámenes probaron que más del 40 % de las células Th, tras una estimulación de 14 días con perlas Expand, portaban el CD40L sobre su superficie (datos no mostrados).

A continuación se cocultivaron  $1 \times 10^6$  de PBMC autólogas recién preparadas/ml en presencia y ausencia de ESAT-6/CFP-10  $10 \mu\text{g/ml}$  con en cada caso 0, 210, 6636 o 66360 células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 preestimuladas *ex vivo* (generación tal como se describe en el Ejemplo 1 en a)) o células Th activadas de forma no específica (generación tal como se describe en el Ejemplo 1 en b)). Después de 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6 y 8 horas se extrajeron del cocultivo en cada caso  $2 \times 10^5$  células y se examinó tal como en el Ejemplo 1 en c) en una RT-qPCR en cuanto a la producción del ARNm de 4-1BBL.

Estos experimentos mostraron una relación directa entre el número de células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 preactivadas y el aumento relativo de la expresión de 4-1BBL en preparaciones de cocultivo estimuladas de manera específica en comparación con no estimuladas. Por el contrario, en preparaciones de cocultivo con células Th preactivadas de manera no específica podía observarse un aumento relativo claramente reducido de la producción

del ARNm del 4-1BBL (Figura 6).

**Ejemplo 5: Especificidad de la inducción de la producción de ARNm de 4-1BBL en cocultivos de PBMC de donantes *M. tuberculosis*, VEB y CMV positivos seleccionados y células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 de *M. tuberculosis*, BZLF1 de VEB o pp65 de CMV preactivadas *ex vivo* en presencia y ausencia de ESAT-6/CFP-10, BZLF1 o pp65**

En un experimento adicional se examinó, si (i) la carga de PBMC con proteína ESAT-6/CFP-10 de *M. tuberculosis*, BZLF1 de VEB y pp65 de CMV *per se* induce una activación no específica del ARNm de 4-1BBL y si (ii) la inducción del marcador de RTT a consecuencia de una interacción de una CPA con una células Th activada tiene lugar de manera específica de antígeno. Para ello se expandieron *ex vivo* con el uso de células Th aisladas de donantes VEB y CMV seropositivos con una infección latente con *M. tuberculosis* tal como se describe en el Ejemplo 1 en el punto a) y se preactivaron. 70000 de las células T auxiliares expandidas *ex vivo* se cocultivaron a continuación con en cada caso  $1 \times 10^6$  PBMC/ml de PBMC autólogas recién preparadas tal como se describe en el Ejemplo 1 en el punto b) en presencia y ausencia de ESAT-6/CFP-10 10 µg/ml, BZLF-1 o pp65. Después de una incubación de 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8 y 10 horas se extrajeron del cocultivo en cada caso  $2 \times 10^5$  células, se sedimentaron durante 5 min a 300 x g y el sedimento se congeló de inmediato en nitrógeno líquido. Hasta el uso adicional se almacenaron las células a -80 °C. El ARN total se aisló según el protocolo tal como se describe en el Ejemplo 1 en c) y se analizó por medio de la técnica de RT-qPCR en cuanto a la producción del ARNm de 4-1BBL.

Estos exámenes probaron que la estimulación de PBMC que contienen CPA con distintos antígenos estimuladores no provoca ninguna activación no específica del ARNm de 4-1BBL. Además estos exámenes probaron que una producción aumentada del ARNm de 4-1BBL en CPA tiene lugar exclusivamente tras un contacto específico de antígeno de células Th activadas con CPA. Si las células Th específicas de *M. tuberculosis* se cultivaron con PBMC autólogas, desencadenaron por sí solas en presencia de ESAT-6/CFP-10 una inducción de la producción de ARNm de 4-1BBL, sin embargo no en presencia de BZLF1 o pp65 o en ausencia de un antígeno (Figura 7 y 8a). Además células Th específicas de BZLF1 o pp65 preactivadas *in vitro* indujeron solo en los cultivos de PBMC autólogas una producción aumentada del ARNm de 4-1BBL, que estaban cargadas con las estructuras objetivo respectivas de las células T activadas respectivas (Figura 8b y 8c).

Además, los exámenes llevados a cabo indican que la eficiencia de la inducción del ARNm de 4-1BBL está inversamente correlacionada con el número de las CTL específicas de antígeno presentes en las PBMC. De este modo, en la sangre de pacientes con TB se encuentran habitualmente muy pocas CTL específicas de ESAT-6/CFP-10, mientras que en sujetos de ensayo CMV y en particular EBV seropositivos puede asociarse un porcentaje significativo o dominante de las presentes células T de memoria de la subpoblación de células T citotóxicas (CTL). En este caso, en cocultivos de células Th preactivadas específicas de ESAT-6/CFP-10 con PBMC cargadas con ESAT-6/CFP-10 podía observarse la activación más intensa y en cocultivos de células Th preactivadas específicas de BZLF1 con PBMC cargadas con BZLF1 la activación más baja del 4-1BBL. Este hallazgo puede aclararse mediante la lisis de las CPA que emiten señales mediante CTL específicas.

**Ejemplo 6: Modulación de la inducción de la producción de ARNm de ligando 4-1BB en cocultivos de PBMC cargadas con BZLF1 y células Th específicas de BZLF1 activadas *ex vivo* mediante adición de un anticuerpo anti-MHC de clase 1 de bloqueo**

Las infecciones por *M. tuberculosis* se controlaron principalmente mediante células Th. Además, también las células T citotóxicas (CTL) desempeñan un papel en la lucha contra el agente patógeno reconociendo y destruyendo células infestadas por los agentes patógenos. En el caso de determinadas infecciones, por ejemplo una infección por virus Epstein-Barr (VEB), las CTL representan una población de linfocitos T dominante. En el caso del procedimiento de acuerdo con la invención, que se basa en la denominada tecnología de células T inversa, RTT, es posible que las CTL también reconozcan y destruyan CPA cargadas con las estructuras objetivo específicas de agente patógeno, incluso antes de que estas expresen el marcador de las CPA, marcador de RTT. De esta manera se reduce el número de posibles CPA que emiten señales y por lo tanto la sensibilidad de la prueba. Para examinar la influencia de células T citotóxicas sobre la sensibilidad del procedimiento de RTT, se llevaron a cabo experimentos de cocultivo con células Th específicas de BZLF1 preactivadas *in vitro* (generación descrita en el Ejemplo 1 en a)) con PBMC autólogas cargadas con BZLF1 en presencia y ausencia de un anticuerpo de bloqueo de MHC-I (10 µg/ml) (anticuerpo HLA ABC, n.º de cat. MCA81EL; clon W6/32 AbD Serotec) tal como se describe en el Ejemplo 1 en b). Mediante la unión del anticuerpo a moléculas de MHC-I sobre células presentadoras de antígenos se impide su reconocimiento por CTL, de modo que no puede tener lugar ninguna destrucción de las CPA cargadas con proteína. Se cocultivaron  $1 \times 10^6$  células/ml en BZM, empleándose por  $1 \times 10^6$  PBMC 70000 células Th preactivadas específicas de BZLF1. En los momentos 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 h se extrajeron en cada caso  $2 \times 10^5$  células de la preparación, se sedimentaron y se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido. Hasta el procesamiento adicional se almacenaron las muestras a -80 °C. A continuación se analizó el contenido de ARNm de 4-1BBL, tal como se describe en el Ejemplo 1 en c), en una RT-qPCR.

En estos experimentos pudo aumentarse claramente mediante el uso de un anticuerpo de bloqueo de MHC de clase 1 la inducción del ARNm de 4-1BBL en el cocultivo de células Th específicas de BZLF1 con PBMC cargadas con

BZLF1 (Figura 9).

**Ejemplo 7: Análisis de la inducción específica de la producción de ARNm de ligando 4-1BB en PBMC de pacientes con tuberculosis activa y latente, así como donantes sanos para la detección indirecta de células Th activadas**

Para examinar si el procedimiento de acuerdo con la invención, procedimiento de RTT, es adecuado para la identificación de pacientes con tuberculosis activa y su limitación de pacientes con tuberculosis latente y donantes sanos, se extrajo sangre en una jeringa heparinizada en cada caso de tres (i) donantes sanos no infectados con *M. tuberculosis* (p012, p010, p008), (ii) donantes sanos con una tuberculosis latente (p009, p006, p005), (iii) donantes, que debido a una tuberculosis activa en los últimos 6 meses se trataron con medicamentos antes del ensayo (p013, p014, p003) y (iv) donantes con una tuberculosis activa antes o poco después del comienzo de una terapia causal (p001, p004, p007) y, de esta sangre se aislaron recientemente PBMC. A continuación se incubaron en cada caso  $1 \times 10^6$  células/ml con ESAT-6/CFP-10  $10 \mu\text{g/ml}$  en atmósfera húmeda a  $37^\circ\text{C}$  y  $\text{CO}_2$  al 5 %. Además se trataron PBMC de donantes seleccionados con los antígenos control, p24 de VIH (antígeno de la cápside) (sanos: p008; latentes: p005 y p006; tratados: p003; activos: p007 y p001) o albúmina de suero bovino (p001) o como control adicional negativo en ausencia de un antígeno. En cada caso se extrajeron  $2 \times 10^5$  células después de 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8 y 10 horas de la incubación, se sedimentaron y se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido. Hasta el procesamiento adicional se almacenaron las células a  $-80^\circ\text{C}$ . Tal como se describe en el Ejemplo 1 en c), se examinó a continuación el contenido de ARNm de 4-1BBL en una RT-qPCR.

Pudo mostrarse que la estimulación con ESAT-6/CFP-10 en PBMC de donantes sanos no tenía como consecuencia ninguna inducción del ARNm de 4-1BBL (Figura 10a). Igualmente no pudo medirse inducción alguna del ARNm de 4-1BBL en PBMC de sujetos de ensayo infectados de manera latente con *M. tuberculosis* (Figura 10b) o sujetos de ensayo que debido a una tuberculosis activa en los últimos 6 meses se trataron con medicamentos antes del ensayo (Figura 10c). Solo en las PBMC de sujetos de ensayo con enfermedad aguda antes o poco después del comienzo de una terapia causal, pudo observarse tras estimulación con ESAT-6/CFP-10 una inducción significativamente aumentada del ARNm de 4-1BBL en cultivos celulares estimulados de manera específica en comparación con cultivos celulares no estimulados (Figura 10d). La estimulación de las PBMC con los antígenos irrelevantes BSA y p24 no llevó igualmente ninguna inducción aumentada del ARNm de 4-1BBL (Figura 10e).

**Ejemplo 8: Inducción de la producción de ARNm de 4-1BBL en PBMC de donantes con tuberculosis aguda y latente, así como de un sujeto de ensayo sano con tuberculina PPD**

Para examinar si puede aumentarse la inducción del ARNm de 4-1BBL en PBMC de pacientes con tuberculosis agudas mediante el uso de un mayor espectro antigénico, se extrajo en cada caso de un sujeto de ensayo con una tuberculosis activa y latente, así como un donante sano, sangre en una jeringa heparinizada y se aislaron recientemente de esta sangre PBMC. A continuación se incubaron  $1 \times 10^6$  células/ml con o bien ESAT-6/CFP-10  $10 \mu\text{g/ml}$  o bien tuberculina PPD (Statens Serum Institut, Dinamarca) en atmósfera húmeda a  $37^\circ\text{C}$  y  $\text{CO}_2$  5 %. Además se incubaron alícuotas de las PBMC como control negativo sin antígenos y como control positivo para la capacidad de inducción de la producción de ARNm de 4-1BBL con, respectivamente, forbol-12-mirestato-13-acetato  $1 \mu\text{g/ml}$  (PMA) (Sigma Aldrich) e ionomicina (Sigma Aldrich). Se extrajeron  $2 \times 10^5$  células después de 0, 2, 4, 6, 8, y 10 horas de la incubación, se sedimentaron y se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido. Hasta el procesamiento adicional se almacenaron las células a  $-80^\circ\text{C}$ . Tal como se describe en el Ejemplo 1 en c), se examinó a continuación el contenido de ARNm de 4-1BBL en una RT-qPCR.

Pudo mostrarse que la estimulación con tuberculina PPD provoca una inducción mucho mayor de la producción de ARNm de 4-1BBL en PBMC del paciente con una tuberculosis aguda que ESAT-6/CFP-10 (Figura 11a, figura superior). Al mismo tiempo no pudo observarse en PBMC del sujeto de ensayo infectado de manera latente así como del sujetos de ensayo sano tanto tras estimulación con tuberculina PPD como también con ESAT-6/CFP-10, ninguna inducción significativamente aumentada de la producción de ARNm de 4-1BBL (Figuras 11b y 11c figuras superiores). Además, en las alícuotas estimuladas con PMA/ionomicina de las PBMC de los tres donantes en comparación con alícuotas no estimuladas de las PBMC pudo observarse una producción claramente aumentada del ARNm de 4-1BBL, mediante lo cual se probó la funcionalidad de las PBMC para la producción de este marcador de RTT (Figuras 11a-c, figuras inferiores).

**Ejemplo 9: Inducción de la expresión de ligando 4-1BB en PBMC de un donante sano en el transcurso del tiempo tras una estimulación con las combinaciones de PMA/ionomicina o PGE2/anti-CD40**

Para la identificación de controles positivos para el procedimiento de RTT de acuerdo con la invención para la detección de células T activadas se examinó si y en qué intensidad las combinaciones de PMA/ionomicina o PGE2/anti-CD40 provocan una inducción no específica de la expresión de ARNm de 4-1BBL. Para ello se incubaron  $1 \times 10^6$  PBMC/ml de un donante sano con en cada caso PMA  $1 \mu\text{g/ml}$  e ionomicina o una combinación de PGE<sub>2</sub>  $5 \mu\text{g/ml}$  (Alexis Biochemicals) y un anticuerpo anti-CD40  $2 \mu\text{g/ml}$  (LEAF-anti CD40; Biozol). Como control negativo sirvieron PBMC no estimuladas. Se extrajeron  $5 \times 10^5$  células después de 0, 2, 4, 6 y 8 horas de incubación, se sedimentaron y se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido. Hasta el procesamiento adicional se almacenaron

las células a -80 °C. Tal como se describe en el Ejemplo 1 en c), se examinó a continuación el contenido de ARNm de 4-1BBL en una RT-qPCR.

Estos exámenes mostraron que PMA e ionomicina (Figura 12a) representan un inductor no específico esencialmente más eficiente de la producción de ARNm de 4-1BBL que la combinación de PGE<sub>2</sub> y el anticuerpo anti-CD40 (Figura 12b).

**Ejemplo 10: Determinación comparativa de la inducción relativa de la producción de ARNm de 4-1BBL en cocultivos no estimulados y estimulados con ESAT-6/CFP-10 de células Th específicas de *M. tuberculosis* preactivadas *in vitro* y PBMC autólogas con el uso de diferentes genes de referencia**

Para la identificación de genes de referencia adecuados para el procedimiento de RTT de acuerdo con la invención se amplificaron en las muestras de ADNc descritas en el Ejemplo 3 con el uso de los sistemas de cebador/sonda asociados los genes de referencia GAPDH, huP0 y PBGD para la normalización de la cantidad de ARNm de 4-1BBL. En este sentido se usaron los sistemas de cebador/sonda para la amplificación de los genes de manera correspondiente a las condiciones de RT-qPCR descritas en el Ejemplo 1 en c).

Para ello se usaron los siguientes sistemas de cebador/sonda:

cebador directo de huP0 GTGGTGCTGATGGGCAAGA, biomers, representado en SEQ ID NO:10; cebador inverso de huP0 GCAGCAGTTTCTCCAGAGCTG, biomers, representado en SEQ ID NO:11; sonda de huP0 FAM-ACCATGATGCGCAAGGCCATCC-TMR, TIB Molbiol, representada en SEQ ID NO:12; cebador directo de PBGD CCAGCTCCCTGCGAAGAG, biomers, representado en SEQ ID NO: 13; cebador inverso de PBGD CACTGAACTCCTGCTGCTCG, biomers, representado en SEQ ID NO:14; sonda de PBGD FAM-CCCAGCTGCAGAGAAAGTTCCCGC-TMR, TIB Molbiol, representada en SEQ ID NO:15. Se evaluó según el método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  con el uso de GAPDH, huP0 y PBGD como gen de referencia y el control no estimulado como calibrador.

Estos exámenes dieron como resultado que el contenido de ARNm de 4-1BBL con los tres genes de referencian puede normalizarse, sin influir considerablemente en el resultado final (Figura 13). Aunque en el caso de la normalización con los tres genes de referencian pudieron observarse ligeras diferencias en la intensidad de la inducción del ARNm de 4-1BBL, la tendencia era comparable.

**Ejemplo 11: Determinación por citometría de flujo de la expresión de ligando 4-1BB en cocultivos de PBMC cargadas con ESAT-6/CFP-10 y células Th específicas de ESAT6/CFP-10 expandidas *ex vivo***

Células Th específicas de ESAT-6/CFP-10 activadas expandidas *in vitro* (generación tal como en el Ejemplo 1 en a)) se mezclaron 1:1 con PBMC autólogas y se cocultivaron en presencia o ausencia de ESAT-6/CFP-10 recombinante en una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en R5 durante 28 h. Durante las últimas 26 h se inhibió la secreción de proteínas mediante brefeldina A. A continuación se marcó la expresión de proteína del 4-1BBL en células B de manera intracelular según el protocolo en el Ejemplo 1 en a) y a continuación se determinó mediante citometría de flujo. Para la tinción de superficie se usaron 5 µl de R-ficoeritrinacianina anti-CD19 7 (PeCy7) (BD) y se usaron para la tinción intracelular del 4-1BBL 20 µl de PE anti-4-1BBL (BD).

Estos exámenes mostraron que ya células B no estimuladas pueden presentar un contenido muy alto de 4-1BBL presentes intracelularmente, mediante lo cual, tras una estimulación con ESAT-6/CFP-10 no puede establecerse ninguna inducción adicional de la expresión de 4-1BBL a nivel de proteína (Figura 2). Estos exámenes prueba que la determinación de procesos de maduración inducidos por células T a nivel del proteína es posible por medio de citometría de flujo así como por medio de la tecnología ELISA y ELISpot debido al diferente contenido y en parte muy alto del marcador de RTT solo con limitaciones.

**Ejemplo 12: Identificación de genes de referencia para el procedimiento de RTT para la normalización de la RT-qPCR. Para ello se corregirán variaciones en el nivel de expresión en diferentes preparaciones de reacción, que no se provocan por el cambio biológico de la expresión en la célula.**

Para la identificación de genes de referencia, que en el procedimiento de RTT son adecuados para el análisis de muestras clínicas, se estimularon muestras de PBMC de distintos grupos de sujetos de ensayo en tres condiciones distintas y se compararon los resultados de RT-qPCR para los genes de referencia con los resultados de la muestra no estimulada de manera correspondiente. Se procesaron muestras de sangre con heparina sódica de dos pacientes con TB infectados activamente, un paciente con TB infectado de manera latente, así como un sujeto de ensayo sano y un sujeto de ensayo sano vacunado con BCG. Para ello se aislaron las PBMC tal como se indica en el Ejemplo 1 en a). A continuación se estimularon  $6 \times 10^6$  PBMC por 6 ml de preparación en medio de células B. Las estimulaciones tuvieron lugar o bien con ESAT6/CFP10 (10 µg/ml), tuberculina PPD (10 µg/ml) o de forma no específica con PMA/ionomicina (en cada caso 1 µg/ml) a lo largo de un periodo de tiempo de 6 h en atmósfera húmeda a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de la incubación se sedimentaron las células a 300 x g durante 10 min, se desechó el sobrenadante, el sedimento se lisó en tampón RLT (QIAGEN) con β-mercaptoetanol al 1 % y se congeló

de inmediato en nitrógeno líquido. El ARN se aisló con el kit RNeasy Mini (QIAGEN) incluyendo una digestión con ADNasa en la columna según las indicaciones del fabricante. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con el kit de transcripción inversa QuantiTect de QIAGEN. La qPCR se llevó a cabo con placas rápidas de 96 pocillos de material de expresión génica Custom TaqMan® (Applied Biosystems) y la mezcla TaqMan Fast Universal Master (Applied Biosystems) en un sistema de PCR en tiempo real ABI StepOnePlus (Applied Biosystems) de manera correspondiente a las indicaciones del fabricante.

El nivel de expresión de un gen de referencia muy adecuado para una RT-qPCR será constante en todas las condiciones experimentales usadas y las estimulaciones previstas en ellas. Además, el nivel de la expresión del gen de referencia corresponderá al nivel de expresión de los genes objetivo. También la eficiencia de qPCR será similar a la de los genes objetivo. Para las cinco muestras se compararon y evaluaron los resultados.

El resultado está representado en la Figura 14. La expresión del gen marcador de RTT *TNFSF9* e *IFNG* para las diferentes condiciones de estimulación se detectó entre Cq 23 y Cq 30 (no mostrado). Los genes *TAF1A* y *HMBS* son adecuados debido a la expresión constante para todas las condiciones de estimulación así como debido al nivel de la expresión en Cq 28-Cq 29 y debido a la eficiencia similar de la RT-qPCR en comparación con la de los genes objetivo (no mostrado) como genes de referencia para los ARN *4-1BBL* de marcador de RTT de – también denominado *TNFSF9* - e *IFN-γ* – también denominado *IFNG*. Para marcadores alternativos con mayores expresiones se tienen en cuenta como genes de referencia adecuados *HPRT1* o *RPLP0*.

En conjunto, mediante estos exámenes pudieron identificarse varios genes de referencia adecuados, cuyo nivel de expresión permanece constante para todas las condiciones experimentales. En función de la intensidad de expresión de los genes marcadores de RTT pueden usarse *TAF1A*, *HMBS* para una baja expresión, *HPRT1* para una expresión media o *RPLP0* para una expresión elevada como genes de referencia. Para los marcadores *TNFSF9* e *IFNG* es adecuado como gen de referencia *TAF1A*.

**Ejemplo 13: Determinación de la expresión de 4-1BBL – también denominado TNFSF9 - en PBMC estimuladas con tuberculina PPD en comparación con muestras no estimuladas de sujetos de ensayo diferentes para la determinación de la expresión de fondo de los marcadores de RTT y de un valor límite para la discriminación de pacientes con una infección por TB activa y sanos**

En muestras de sangre de 21 sujetos de ensayo se llevaron a cabo el procedimiento de RTT de acuerdo con la invención, para obtener información sobre la expresión de fondo promedio del marcador de RTT *4-1BBL* – también denominado *TNFSF9* - en personas sanas y pacientes con una TB latente. Para ello se aislaron las PBMC tal como se indica en el Ejemplo 1 en a). Por preparación se incubaron  $5 \times 10^6$  PBMC en medio de células B en presencia y ausencia de tuberculina PPD 10 µg/ml a lo largo de un periodo de tiempo de 6 h en atmósfera húmeda a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Las estimulaciones se prepararon por duplicado y se procesaron independientemente. Después de la incubación se sedimentaron las células, se lisaron en tampón RLT (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) con DTT 40 mM y el lisado se congeló de inmediato en nitrógeno líquido. El ARN se aisló con el kit RNeasy Mini de QIAGEN incluyendo una digestión con ADNasa sobre la columna según las indicaciones del fabricante. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con en cada caso 1 µg de ARN con el kit de transcripción inversa QuantiTect (QIAGEN) según las indicaciones del fabricante. La qPCR se llevó a cabo con 1 µl de ADNc en 10 µl de volumen de reacción total con el uso de la mezcla madre de PCR TaqMan® Fast Universal de Applied Biosystems. La mezcla madre tenía la siguiente composición: cebador directo de *TNFSF9* 300 nM GAGGGTCCCGAGCTTTCG, representado en SEQ ID NO:1; cebador inverso de *TNFSF9* 300 nM GCCCATCGATCAGCAGAAC, representado en SEQ ID NO:2; sonda de *TNFSF9* 200 nM FAM-CCACCAGCTGCGCAAACATGC-TMR, representada en SEQ ID NO:3; 1x mezcla madre de PCR TaqMan® Fast Universal, 1x ensayo de expresión génica TaqMan® TAF1A VIC sonda de MGB marcada con colorante (*primer limited*) de Applied Biosystems. El perfil de temperatura de la qPCR comprendía 20 s de desnaturalización a 95 °C y a continuación 40 ciclos que consistían en 3 s a 95 °C y 30 s a 60 °C. La qPCR se llevó a cabo en el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems). En la Figura 15 están representados los valores medios de los resultados de en cada caso dos estimulaciones independientes del análisis de Cq comparativo ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ) para las 21 muestras.

Estos exámenes muestran que el aumento de expresión relativo del marcador de RTT *TNFSF9* tras estimulación para sujetos de ensayo con una TB latente, personas sanas y personas sanas vacunadas con BCG se encontraba por debajo o como máximo en el doble, mientras que pacientes con TB infectados activamente mostraban un aumento de expresión superior a 2 veces. De esta manera pudo establecerse un valor límite provisional de  $2^{-\Delta\Delta Cq} = 2,0$ . Una diferenciación de pacientes con TB infectados activamente y personas sanas o sujetos de ensayo con una TB latente con el procedimiento de RTT es por lo tanto posible.

**Ejemplo 14: Mejora de la expresión de IFN-γ – también denominado IFNG - mediante el uso de medios sin suero, en parte sintéticos, alternativos**

Para someter a ensayo si la señal de *IFN-γ* – también denominada *IFNG* – puede aumentar mediante el uso de medios de cultivo celular alternativos se sometieron a prueba varios medios en parte sintéticos. El medio de células B usado convencionalmente contiene IL-4, que podía llevar a la inhibición de la señal de IFNG. Además el medio AB



5 contiene suero de producción propia, mediante lo cual no podían mantenerse óptimas las condiciones estándar, es decir, condiciones constantes sin oscilaciones de calidad. Para muestras de sangre de tres sujetos de ensayo con una TB latente y de tres personas sanas se llevó a cabo el procedimiento de RTT de acuerdo con la invención. Para ello se aislaron las PBMC tal como se indica en el Ejemplo 1 en a). Por cada preparación se incubaron  $5 \times 10^6$  PBMC en 2,5 ml de los diferentes medios de cultivo celular en presencia o ausencia de tuberculina PPD 10  $\mu\text{g/ml}$  6 h en atmósfera húmeda a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Se sometieron a prueba los siguientes medios: medio de células B (BZM+), medio de células B sin IL-4 (BZM-), medio UltraCULTURE™ sin suero (Ultra) de LONZA y medio AIM V (AIMV) de Invitrogen. La lisis celular, extracción de ARN, síntesis de ADNc y qPCR se llevó a cabo tal como se describe en el Ejemplo 13. El aumento de expresión se determinó para *IFNG* y *4-1BBL* – también denominado *TNFSF9* - (véanse la Figura 16 y la Figura 17). La mezcla madre para *IFNG* tenía la siguiente composición: cebador directo de *IFNG* 300 nM GTGGAGACCATCAAGGAAGACAT (biomers), representado en SEQ ID NO:7; cebador inverso de *IFNG* 300 nM GGCGACAGTTCAGCCATCA (biomers), representado en SEQ ID NO:8; sonda de *IFNG* 200 nM FAM-TTCATGTATTGCTTTGCGTTGGACATTCAA-TMR (TIB MOLBIOL), representada en SEQ ID NO:9; 1x mezcla madre de PCR TaqMan® Fast Universal, 1x ensayo de expresión génica TaqMan® TAF1A VIC sonda de MGB marcada con colorante (*primer limited*) de Applied Biosystems. La mezcla madre para *TNFSF9* tenía la siguiente composición: cebador directo de *TNFSF9* 300 nM GAGGGTCCCGAGCTTTTCG (biomers), representado en SEQ ID NO:1; cebador inverso de *TNFSF9* 300 nM GCCCATCGATCAGCAGAAC (biomers), representado en SEQ ID NO:2; sonda de *TNFSF9* 200 nM FAM-CCACCAGCTGCGCAAACATGC-TMR (TIB MOLBIOL), representada en SEQ ID NO:3; 1x Mezcla madre de PCR TaqMan® Fast Universal, 1x Ensayo de expresión génica TaqMan® TAF1A VIC sonda de MGB marcada con colorante (*primer limited*) de Applied Biosystems. El perfil de temperatura de la qPCR comprendía 20 s de desnaturalización a 95 °C y a continuación 40 ciclos que consistían en 3 s a 95 °C y 30 s a 60 °C. La qPCR se llevó a cabo en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems).

25 El aumento de expresión relativo de *IFNG* ( $2^{-\Delta\Delta C_q}$ ) era tras estimulación tanto en medio UltraCULTURE™ como en medio AIM V claramente más intenso que en BZM+ convencional. La retirada de IL-4 del medio de células B (BZM-) no llevó a un refuerzo de la señal (Figura 16). Un aumento de expresión relativo de *TNFSF9* en muestras de pacientes con una TB latente y en sujetos de ensayo sanos no pudo para la estimulación en medio UltraCULTURE™. Por el contrario, la estimulación en medio AIM V llevó a una inducción no específica fuerte de la expresión de ARN de *TNFSF9* en comparación con los medios de células B o el medio UltraCULTURE™ (Figura 17).

Estos exámenes muestran que la elección del medio puede tener una fuerte influencia sobre la expresión relativa de genes marcadores de RTT. El uso del medio UltraCULTURE™ sin suero de LONZA lleva a una clara intensificación de la señal de *IFNG* en muestras de sujetos de ensayo con una TB latente con una expresión de fondo constante del gen marcador de RTT *TNFSF9*.

#### **Ejemplo 15: Detección sincrónica de dos genes marcadores de RTT con normalización simultánea frente a un gen de referencia con el uso de un qPCR triple**

40 Para simplificar y mejorar la practicabilidad así como ampliar el ámbito de aplicación del procedimiento de RTT de acuerdo con la invención se desarrolló una RT-qPCR triple, que permite detectar al mismo tiempo en una preparación de reacción el marcador de RTT *4-1BBL* – también denominado *TNFSF9* - y el marcador para la detección de una infección por TB latente *IFN- $\gamma$*  – también denominado *IFNG* - y adicionalmente normalizar las señales con ayuda de un gen de referencia. Una muestra de un sujeto de ensayo con una TB latente se procesó de manera correspondiente al procedimiento de acuerdo con la invención, tal como se describe en el Ejemplo 12. La qPCR se llevó a cabo con 1  $\mu\text{l}$  de ADNc en 10  $\mu\text{l}$  de volumen de reacción total con el uso de la mezcla madre de PCR TaqMan® Fast Universal de Applied Biosystems. La mezcla madre tenía la siguiente composición: cebador directo de *TNFSF9* 150 nM GAGGGTCCCGAGCTTTTCG (biomers), representado en SEQ ID NO:1; cebador inverso de *TNFSF9* 150 nM GCCCATCGATCAGCAGAAC (biomers), representado en SEQ ID NO:2; sonda de *TNFSF9* 200 nM FAM-CCACCAGCTGCGCAAACATGC-BBQ (TIB MOLBIOL), representada en SEQ ID NO:3; cebador directo de *IFNG* 300 nM GTGGAGACCATCAAGGAAGACAT (biomers), representado en SEQ ID NO:7; cebador inverso de *IFNG* 300 nM GGCGACAGTTCAGCCATCA (biomers), representado en SEQ ID NO:8; sonda de *IFNG* 200 nM BoTMRTTCATGTATTGCTTTGCGTTGGACATTCAA-BBQ (TIB MOLBIOL), representada en SEQ ID NO:9; 1x Mezcla madre de PCR TaqMan® Fast Universal, 1x Ensayo de expresión génica TaqMan® TAF1A VIC sonda de MGB marcada con colorante (*primer limited*) de Applied Biosystems. El perfil de temperatura de la qPCR comprendía 20 s de desnaturalización a 95 °C y a continuación 40 ciclos que consistían en 3 s a 95 °C y 30 s a 60 °C. La qPCR se llevó a cabo en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems). En la Figura 18 están representados los resultados del análisis de Cq comparativo ( $2^{-\Delta\Delta C_q}$ ) para una muestra de un sujeto de ensayo con una TB latente. Se muestran los resultados de las qPCR triples (izquierda) y como comparación los resultados de las qPCR dobles correspondientes (derecha). Las preparaciones para las qPCR dobles se prepararon tal como se describe en el Ejemplo 14.

Este análisis comparativo muestra que la detección de marcadores de RTT es posible en principio en una reacción múltiple con normalización simultánea de los valores mediante un gen de referencia.

65

**Ejemplo 16: Determinación de la expresión de genes marcadores adicionales para el procedimiento de RTT de acuerdo con la invención en PBMC estimuladas con tuberculina PPD en comparación con muestras no estimuladas de dos sujetos de ensayo**

5 Par conseguir una mayor sensibilidad del procedimiento de RTT de acuerdo con la invención, se sometieron a prueba genes marcadores adicionales en una RT-qPCR con el sistema SYBR Green. Para ello se procesaron en cada caso una muestra de un paciente con una TB latente y de un sujeto de ensayo sano de manera correspondiente al procedimiento de acuerdo con la invención, tal como se describe en el Ejemplo 12. La qPCR se llevó a cabo con 1 µl de ADNc en 20 µl de volumen de reacción total con el uso de la mezcla madre Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR de Agilent Technologies. La mezcla madre tenía la siguiente composición: cebador directo 300 nM, cebador inverso 300 nM, 1x mezcla madre Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR, colorante de referencia 300 nM. Se usaron los siguientes pares de cebadores: cebador directo de FCGR1A/B/C GAAGGGGTGCACCGGAA (TIB MOLBIOL), representado en SEQ ID NO:16; cebador inverso de FCGR1A/B/C CTCACGGGGAGCAAGTGG (TIB MOLBIOL), representado en SEQ ID NO:17; cebador directo de CXCL9 GAGTGAAGGAACCCAGTAGT, representado en SEQ ID NO:18; cebador inverso de CXCL9 GGTGGATAGTCCCTTGTTGGT, representado en SEQ ID NO:19; cebador directo de CXCL10 TCCACGTGTTGAGATCATTGC, representado en SEQ ID NO:20; cebador inverso de CXCL10 TCTTGATGGCCTTCGATTCTG, representado en SEQ ID NO:21; cebador directo de CXCL11 CAAGGCTTCCCATGTTCA, representado en SEQ ID NO:22; cebador inverso de CXCL11 CCCAGGGCGTATGCAAAGA, representado en SEQ ID NO:23 (todos los cebadores de CXCL del trabajo de doctorado de Theresa Knoblach, 2010, Das citomegalovirus IE1-Proteina als Regulator des humanen Transkriptoms und Zielstruktur RNAi-basierter Therapiestrategien, Universidad de Regensburg). El perfil de temperatura de la qPCR comprendía 3 min de desnaturalización a 95 °C y a continuación 40 ciclos que consistían en 5 s a 95 °C y 10 s a 60 °C. La qPCR se llevó a cabo en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems). En la Figura 19 están representados los resultados del análisis de Cq comparativo (2<sup>ΔCq</sup>) para ambas muestras.

Este análisis comparativo de muestras estimuladas y no estimuladas de un paciente con TB infectado de manera latente o una persona sana indica que estos genes pueden ser adecuados como marcadores para la detección de enfermedades de TB latentes.

30 <110> Lophius Biosciences GmbH

<120> Procedimiento para la detección, diferenciación y cuantificación de poblaciones de células T por medio de la tecnología de PCR en tiempo real cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR)

35 <130> LOP-004 PCT

<140> Aún no conocido

<141> 16-09-2011

40 <150> 10 2010 037 622.1

<151> 17-09-2010

<160> 23

45 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 18

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador directo de 4-1BBL

55 <400> 1

gagggtcccg agctttcg 18

<210> 2

60 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> cebador inverso de 4-1BBL

<400> 2  
 gcccatcgat cagcagaac 19  
  
 5 <210> 3  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 10 <220>  
 <223> sonda de 4-1BBL  
  
 <400> 3  
 ccaccagctg cgcaaacatgc 21  
  
 15 <210> 4  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> cebador directo de GAPDH  
  
 <400> 4  
 gaaggtgaag gtcggagtc 19  
  
 25 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> cebador inverso de GAPDH  
  
 <400> 5  
 gtaaaccatg tagttgaggt c 21  
  
 35 <210> 6  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> sonda de GAPDH  
  
 45 <400> 6  
 tcattgatgg caacaatc cact 24  
  
 <210> 7  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> cebador directo de IFNG  
  
 55 <400> 7  
 gtggagacca tcaaggaaga cat 23  
  
 <210> 8  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 60 <220>  
 <223> cebador inverso IFNG  
  
 65

<400> 8  
 ggcgacagtt cagccatca 19

5 <210> 9  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sonda de IFNG Sonde

<400> 9  
 ttcattgtatt gctttgcgtt ggacattcaa 30

15 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador directo de huP0

<400> 10  
 gtggtgctga tgggcaaga 19

25 <210> 11  
 <211>21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> cebador inverso huP0

<400> 11  
 gcagcagttt ctccagagct g 21

35 <210> 12  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> sonda de huP0

45 <400> 12  
 accatgatgc gcaaggccat cc 22

<210> 13  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> cebador directo de PBGD

55 <400> 13  
 ccagctccct gcgaagag 18

60 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> cebador inverso de PBGD

<400> 14  
 cactgaactc ctgctgctcg 20

5 <210> 15  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> sonda de PBGD

<400> 15  
 cccagctgca gagaaagttc ccgc 24

15 <210> 16  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador directo de FCGR1A/B/C

<400> 16  
 gaaggggtgc accggaa 17

25 <210> 17  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> cebador inverso de FCGR1A/B/C

<400> 17  
 ctcacgggga gcaagtgg 18

35 <210> 18  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> cebador directo de CXCL9

45 <400> 18  
 gagtgcaagg aacccagta gt 22

<210> 19  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> cebador inverso de CXCL9

55 <400> 19  
 ggtgatagtagt cccttggtg gt 22

<210> 20  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> cebador directo de CXCL10

65

# ES 2 613 039 T3

<400> 20  
tccacgtgtt gagatcattg c 21

5 <210> 21  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cebador inverso de CXCL10

<400> 21  
tcttgatggc ctgcattct g 21

15 <210> 22  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> cebador directo CXCL11

<400> 22  
caaggcttcc ccatgttca 19

25 <210> 23  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> cebador inverso de CXCL11

<400> 23  
cccagggcgt atgcaaaga 19

35

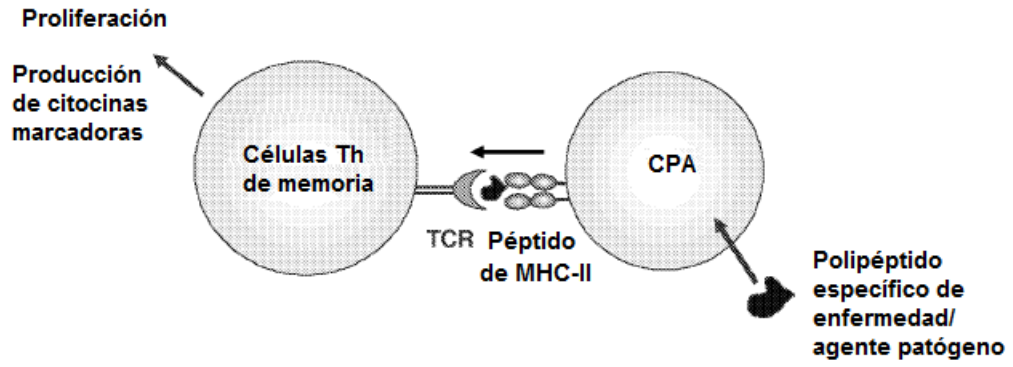
## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección, la diferenciación y la cuantificación de poblaciones de células T, que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) poner en contacto una primera alícuota de un fluido corporal de un individuo con al menos un antígeno, conteniendo el fluido corporal células presentadoras de antígenos (CPA) y células T,  
 b) incubar la primera alícuota con el al menos un antígeno a lo largo de un periodo de tiempo determinado,  
 10 c) detectar y diferenciar las poblaciones de células T mediante detección de al menos un primer marcador de las CPA inducido por las células T de una población de células T determinada en la primera alícuota y en una segunda alícuota del fluido corporal del individuo, que no se incubó con el al menos un antígeno, mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) y  
 d) detectar y cuantificar las poblaciones de células T determinando la relación del marcador detectado de las CPA de la primera alícuota con respecto a la segunda alícuota.
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa c) se detecta adicionalmente al menos un segundo marcador en la primera y en la segunda alícuotas, siendo el propio segundo marcador un marcador inducido de las células T, y la etapa d) comprende la detección y la cuantificación de las poblaciones de células T determinando la relación del primer marcador detectado de las CPA y del segundo marcador de la célula T de la primera alícuota con respecto a la segunda alícuota.
- 20 3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, comprendiendo el procedimiento en la etapa a) una etapa adicional a') poner en contacto la segunda alícuota con al menos un antígeno y en la etapa b) una etapa adicional b') incubar la segunda alícuota con el antígeno a lo largo de un periodo de tiempo determinado, diferenciándose el periodo de tiempo en la etapa b') del periodo de tiempo en la etapa b), y en lugar de la etapa c) una etapa c') detectar y diferenciar las poblaciones de células T mediante detección del primer marcador en la primera y la segunda alícuotas mediante RT-qPCR, y la etapa d).
- 25 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa c') comprende la detección y la diferenciación de las poblaciones de células T mediante la detección del primer y del segundo marcadores.
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la alícuota del fluido corporal se separa en una alícuota A que contiene solo CPA y en una alícuota B que contiene células T, y en el que la etapa a) comprende una etapa a1) poner en contacto la alícuota A con al menos un antígeno, y una etapa posterior a2) poner en contacto la alícuota A puesta en contacto con el al menos un antígeno con la alícuota B.
- 35 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las poblaciones de células T contienen células T vírgenes, células T activadas o células T de memoria.
- 40 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las células T de las poblaciones de células T son células T CD4<sup>+</sup>, células Th-1, células Th-2, células Th-17, células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, células Th-3, células T CD8<sup>+</sup>, células T citotóxicas CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, células NKT CD161<sup>+</sup> y/o una mezcla de distintas células T.
- 45 8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el fluido corporal es sangre, líquido cefalorraquídeo, linfa, líquido pericárdico, un lavado bronquial, una punción de médula ósea, una suspensión de tejido linfático o una población de PBMC purificada.
- 50 9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el antígeno es un péptido, un oligopéptido, un polipéptido, una proteína, un ARN o un ADN.
- 55 10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el antígeno es un antígeno de una bacteria, un virus, una planta, un animal, un hongo o un parásito y/o el antígeno se selecciona del grupo que consiste en PSA, HER-2/neu, mucina-1, MAGE, CEA, proteína básica de la mielina (PBM), glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG), proteína proteolipídica de la mielina (PLP), mielina, insulina B, Pre-Pro-insulina, IA-2, GAD65, Hsp60, ESAT-6, CFP-10, TB7.7, TB37.6, MPT63, tuberculina PPD, VlsE, p58 (BBQ03), p14, p21-24 (OspC), p37-38 (FlaA), p41, p19 (OspE), p18, Crasp3, BB0323, p26 (OspF), p28 (OspD), p30, p39 (BmpA), p60-65 (antígeno común, Hsp60), p83-100, p17 (Osp17), p31-32 (OspA), p34 (Osp B), lípidos de Borrelia, un lisado de cepas de Borrelia, Pr55<sup>ag</sup>, p24, p17, POL, RT, nef, pp65, IE1, IE2, BZLF1, EBNA3, EBNA2, EBNA6, BMLF1, EBNA1, ORF1, ORF4, PRF62, ORF68, HBsAg, HBcAg y AdV5.
- 60 11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el periodo de tiempo de la puesta en contacto en la etapa a) y de la incubación en la etapa b) asciende a de 0 horas a 72 horas, preferentemente a 4, 6 u 8 horas.
- 65

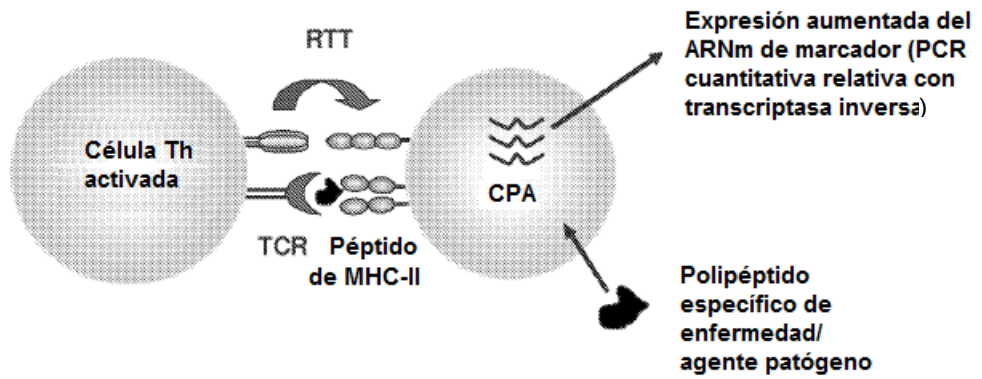
12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el primer marcador de las CPA o el segundo marcador de la célula T es un ácido nucleico, en particular un ARN, un ADN o un fragmento de ácido nucleico y se induce mediante la puesta en contacto y la incubación con el al menos un antígeno.
- 5 13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el marcador de las CPA es ligando 4-1BB (4-1BBL), ligando OX40 (OX40L), TNFSF (CD70), B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32), FcγRI (CD64) o un representante adicional de la superfamilia de TNF/receptor de TNF o de inmunoglobulinas y/o el  
10 marcador de la célula T es IFN-β, INF-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, TGF-β, MIP1a, MIP1b, 4-1BB, CD25, perforina y/o granzima.
14. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la detección y la cuantificación en las etapas c) y d) se lleva a cabo adicionalmente mediante PCR, PCR cuantitativa (qPCR), micromatriz, FACS, ELISpot o ELISA.



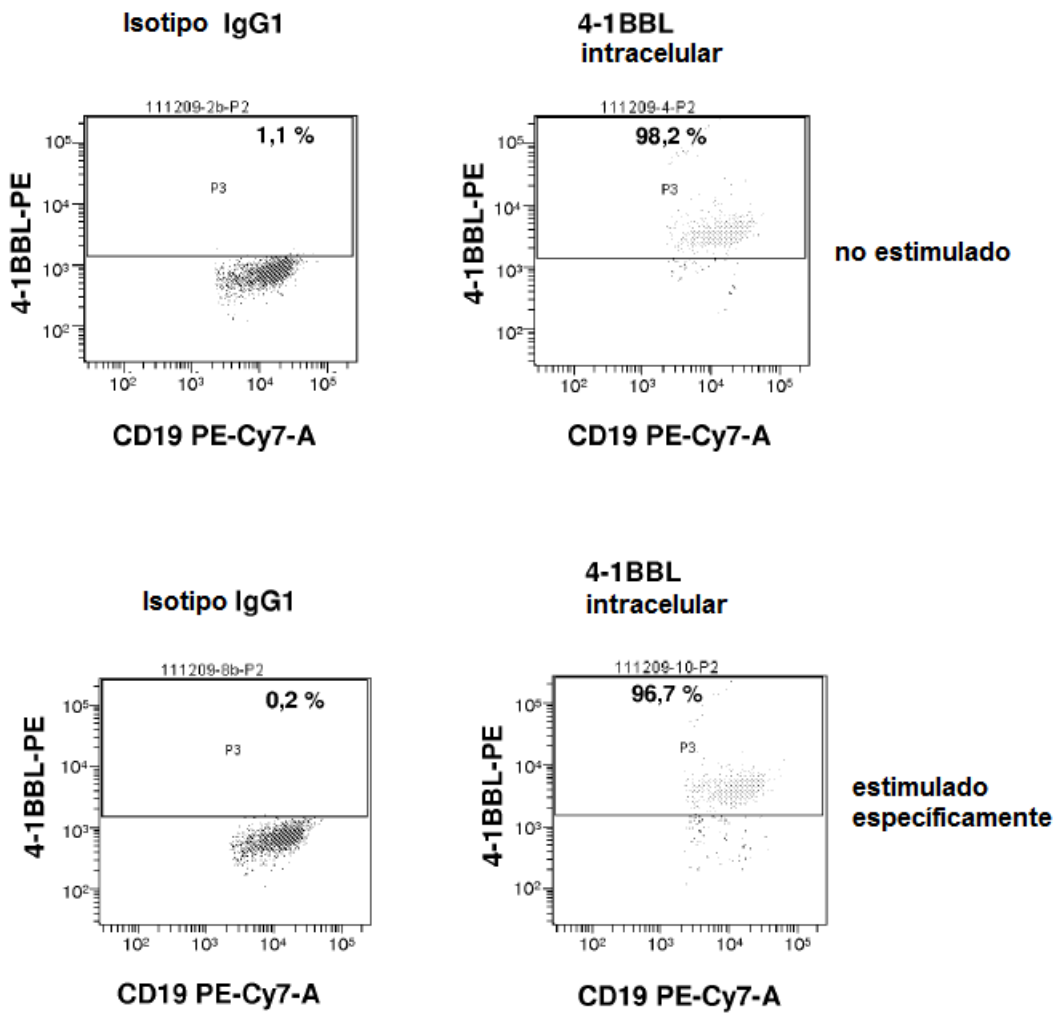
**Figura 1 A**



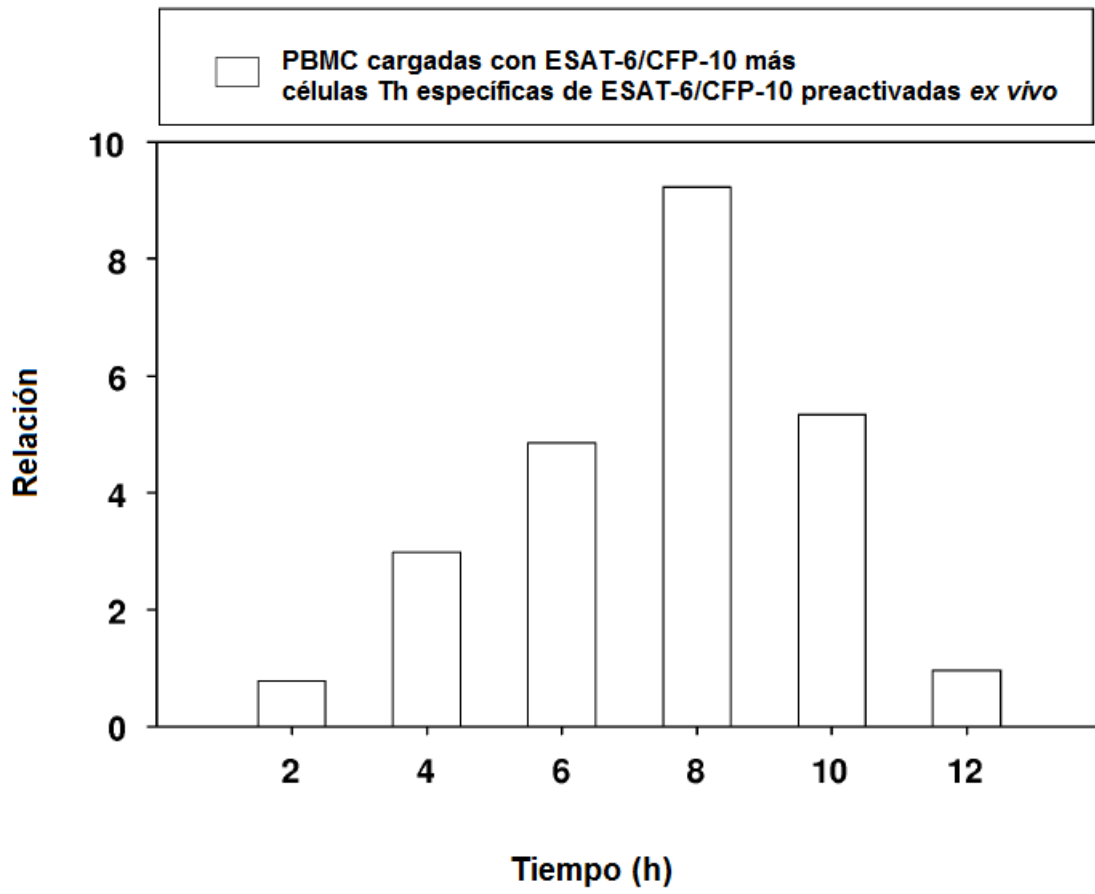
**Figura 1 B**



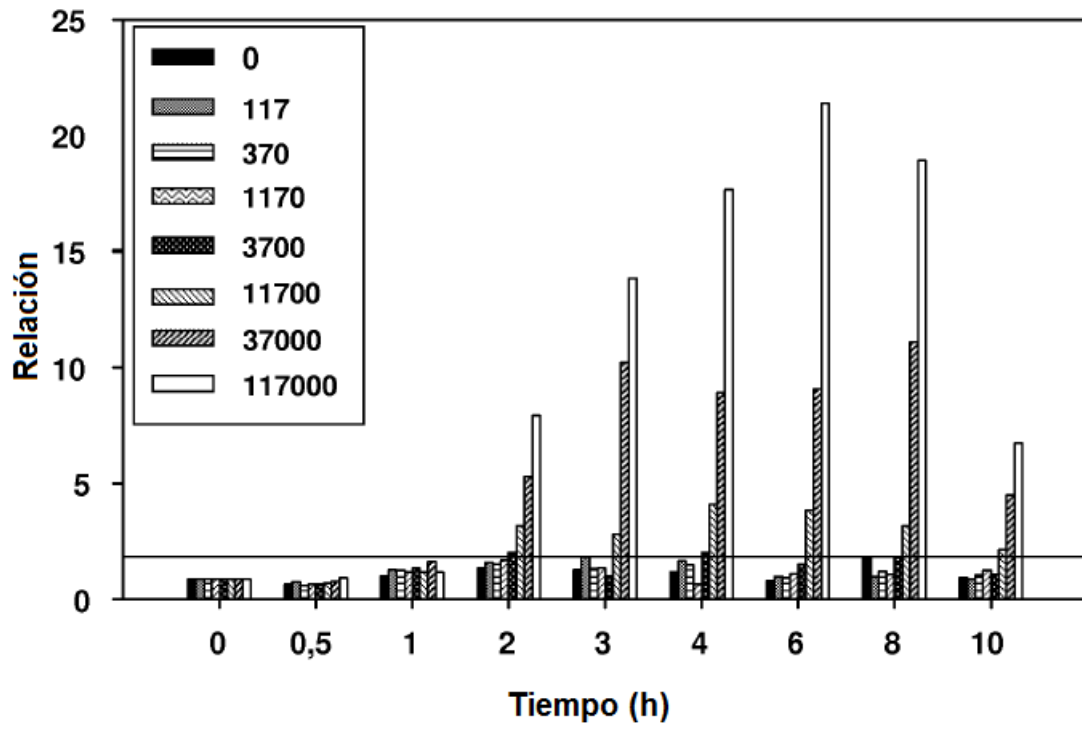
**Figura 2**



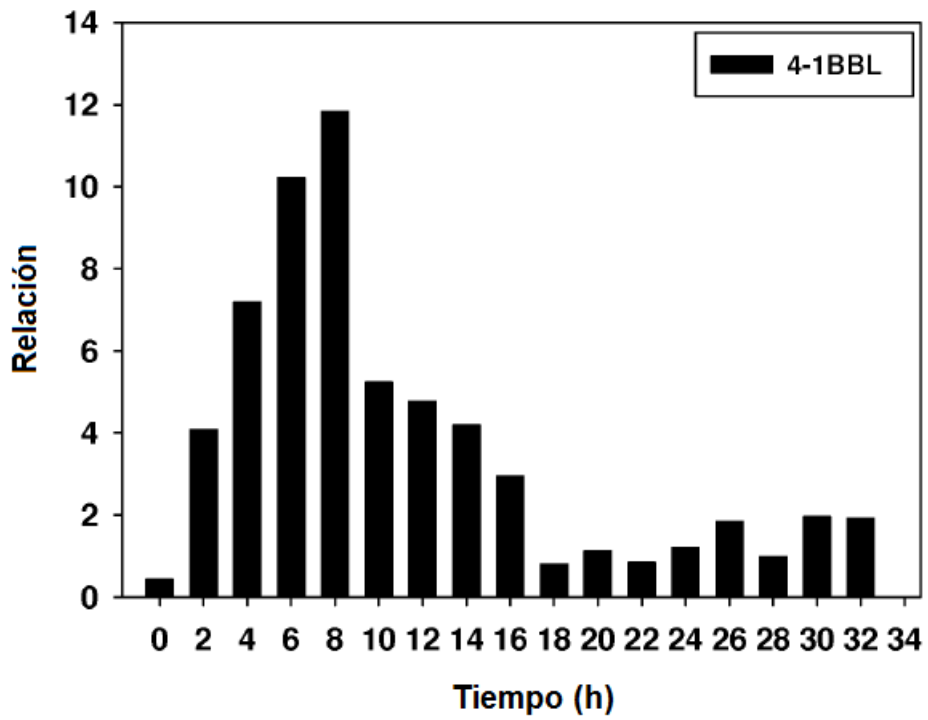
**Figura 3**



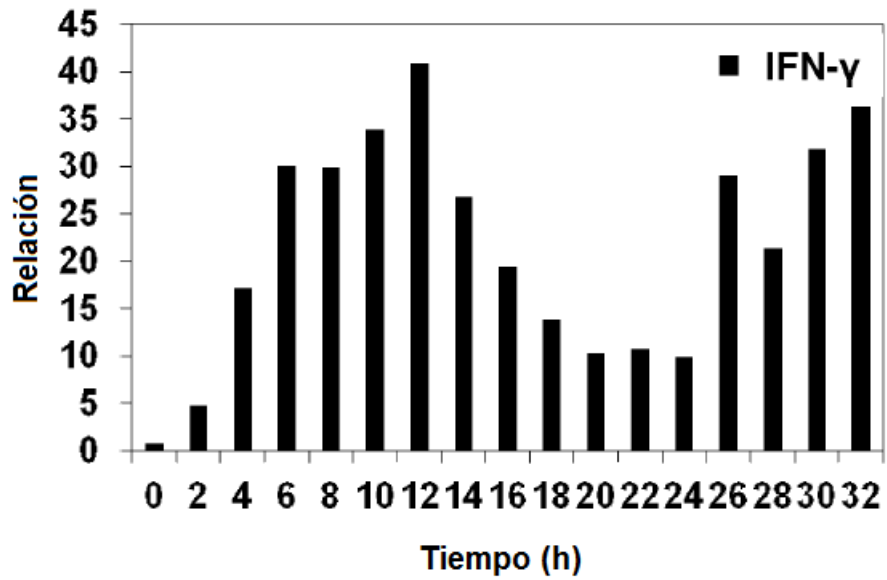
**Figura 4**



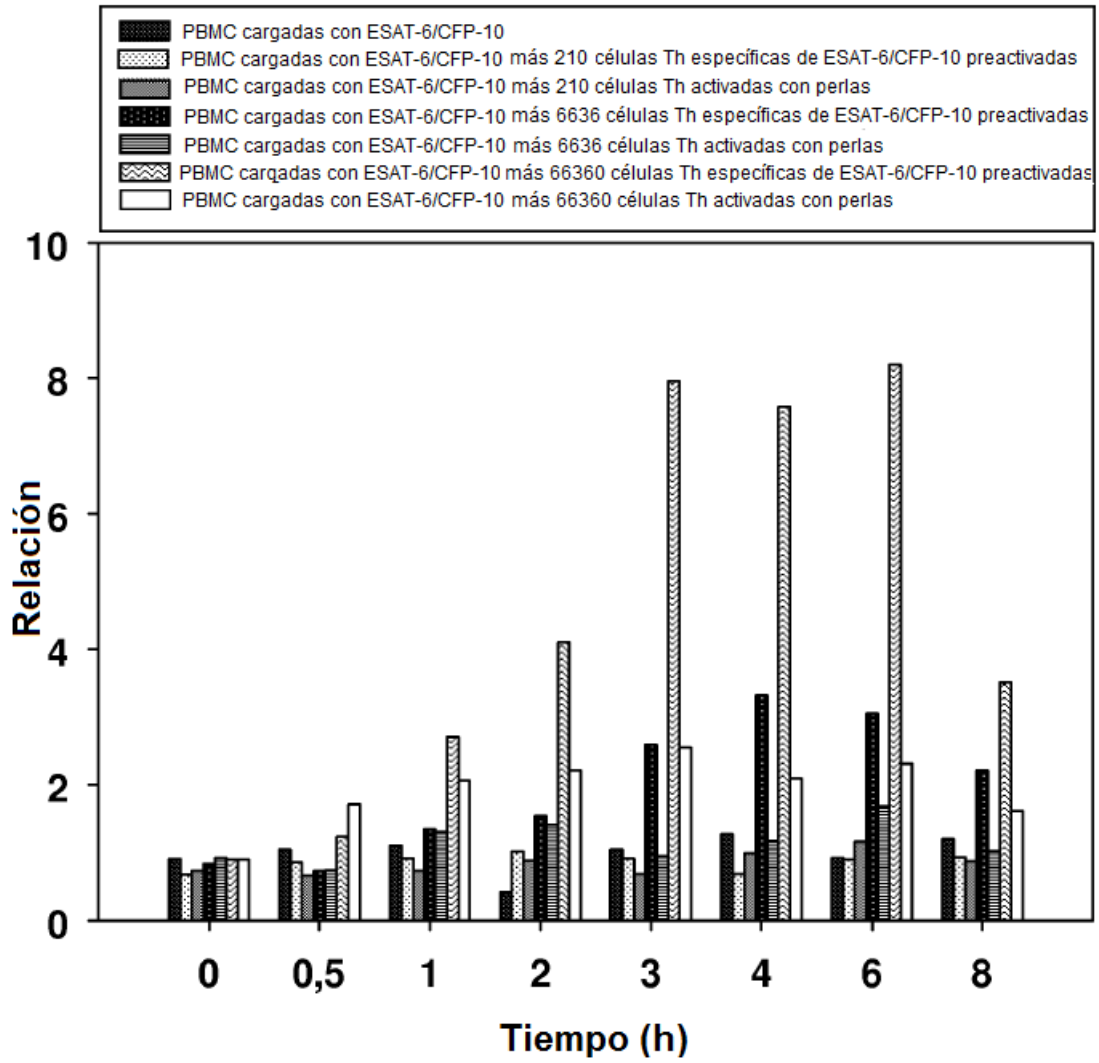
**Figura 5 A**



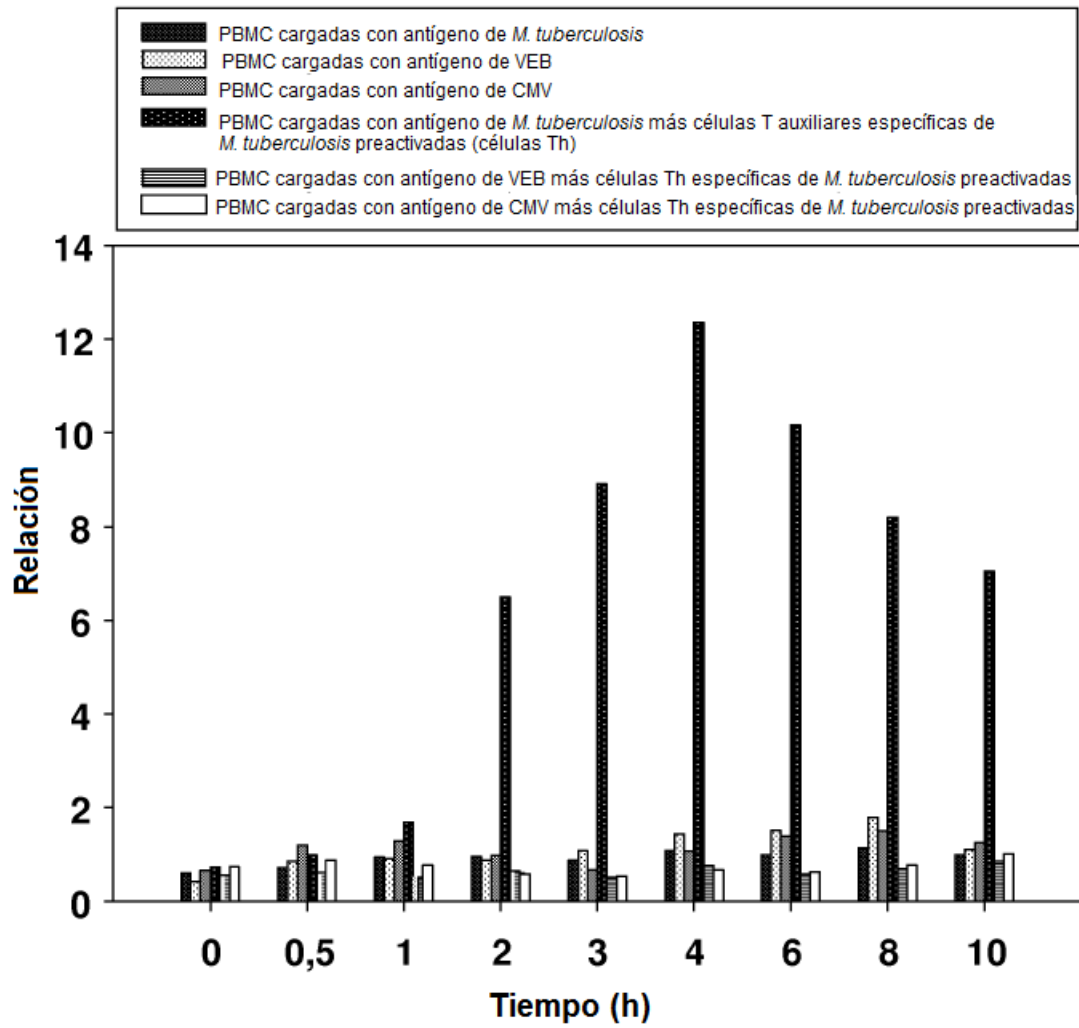
**Figura 5 B**



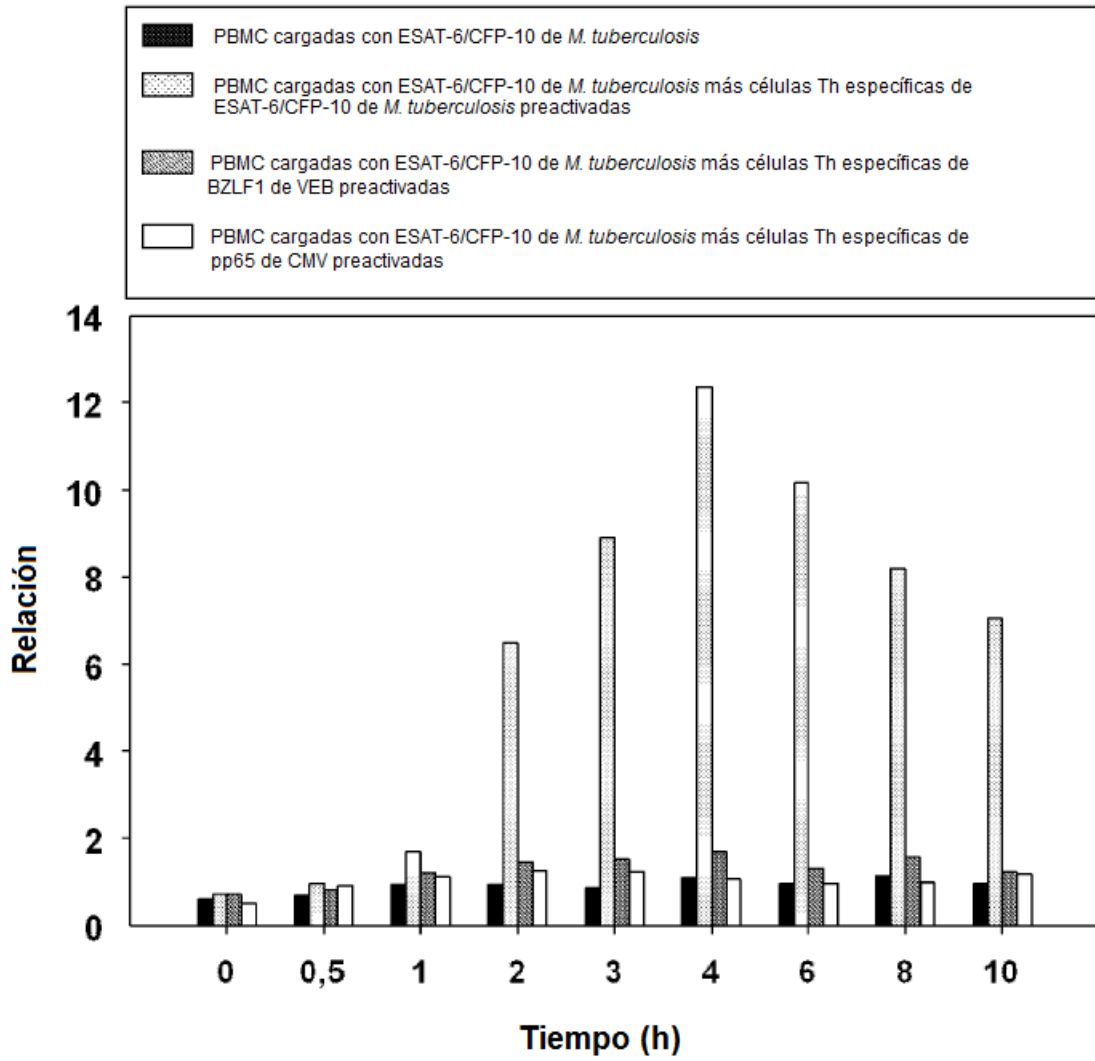
**Figura 6**



**Figura 7**

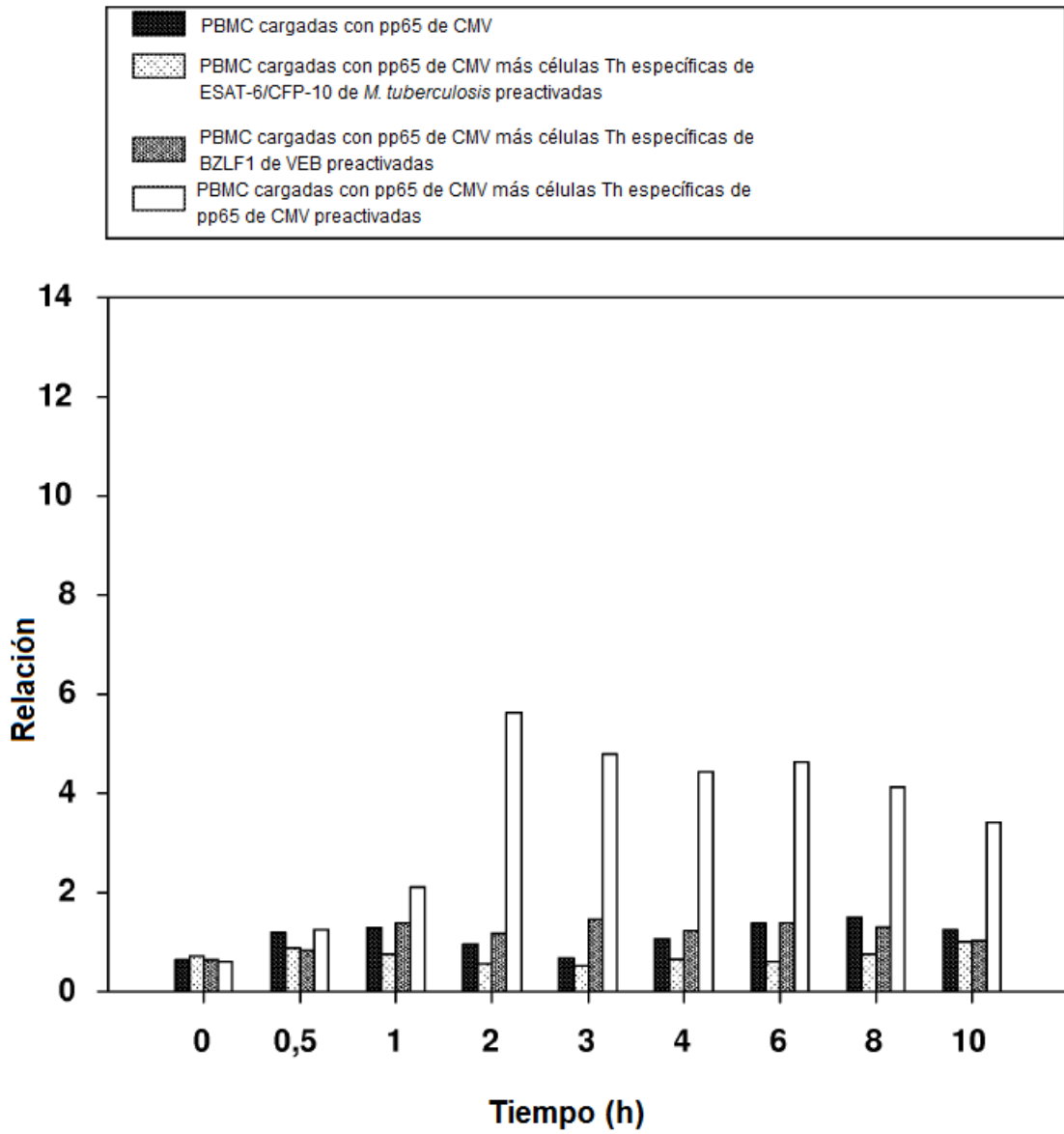


**Figura 8 A**

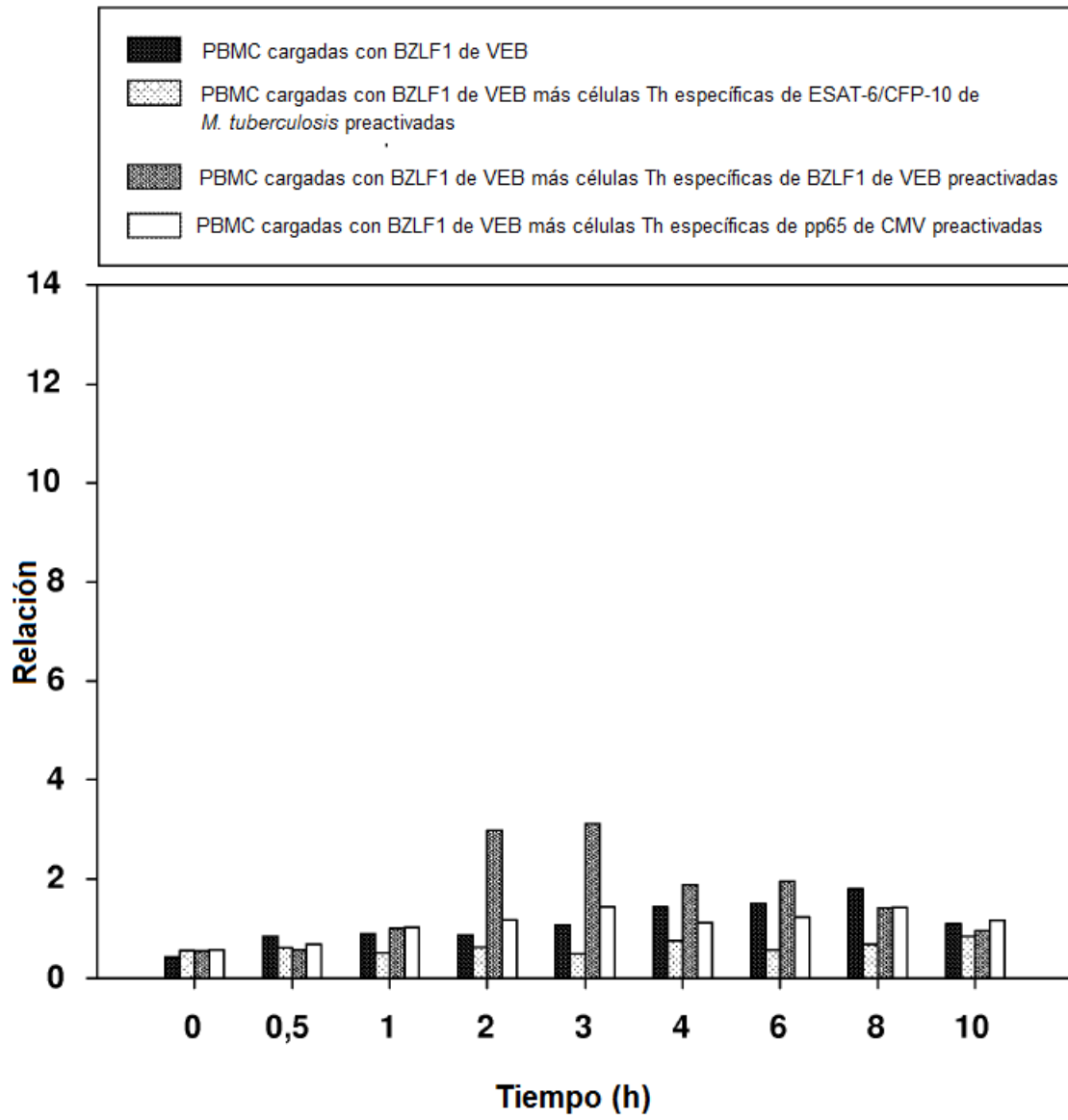




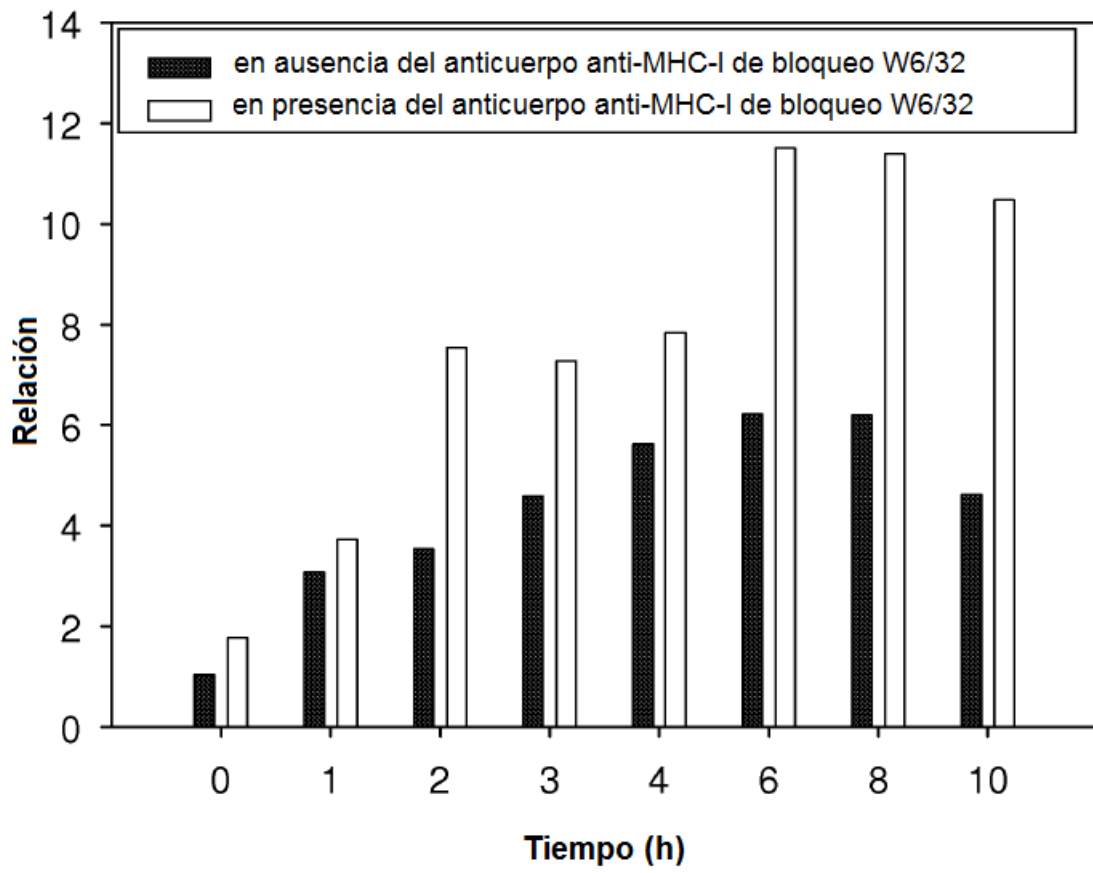
**Figura 8 B**



**Figura 8 C**



**Figura 9**



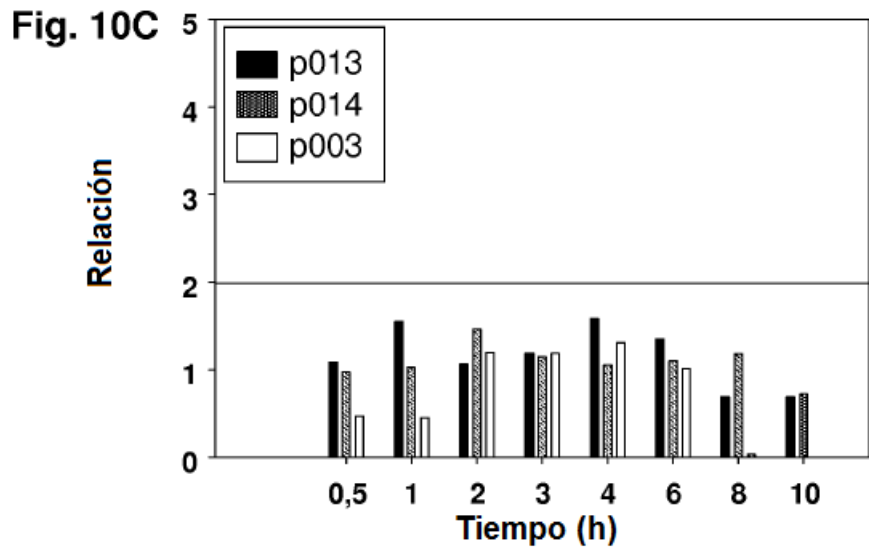
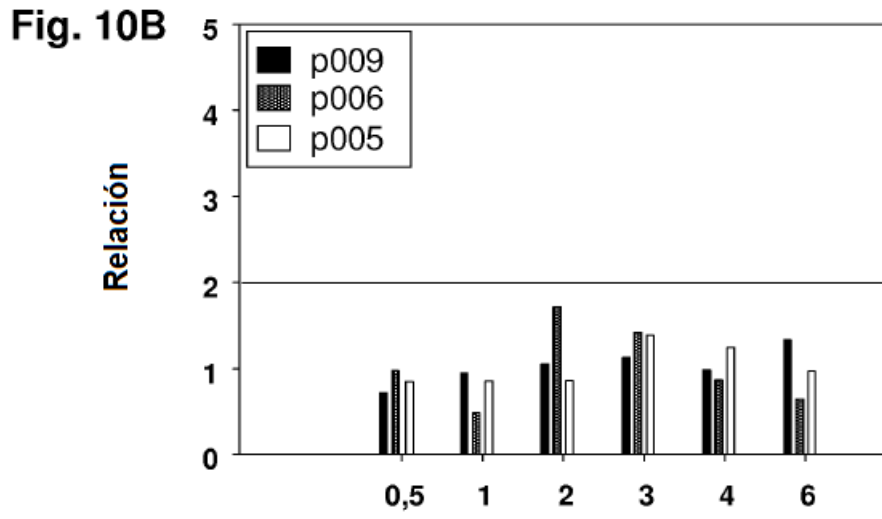
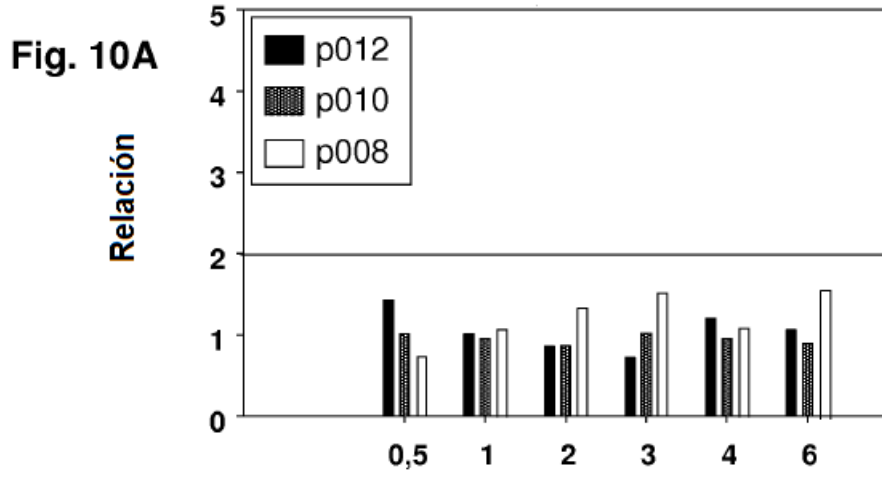


Fig. 10D 5

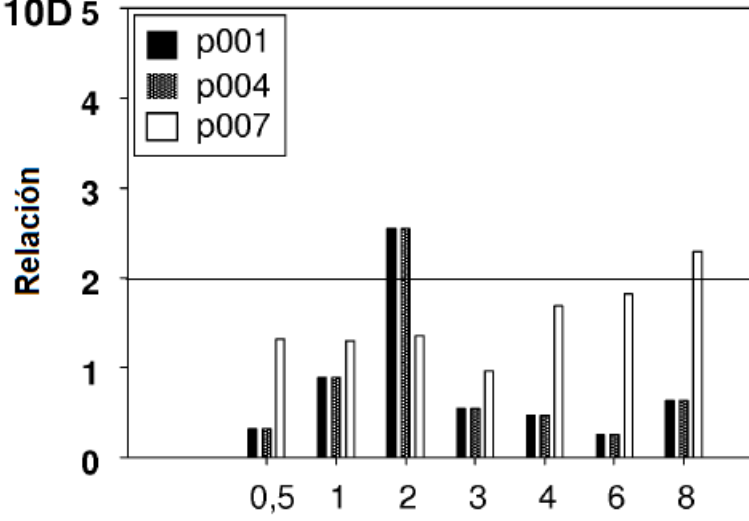


Fig. 10E 5

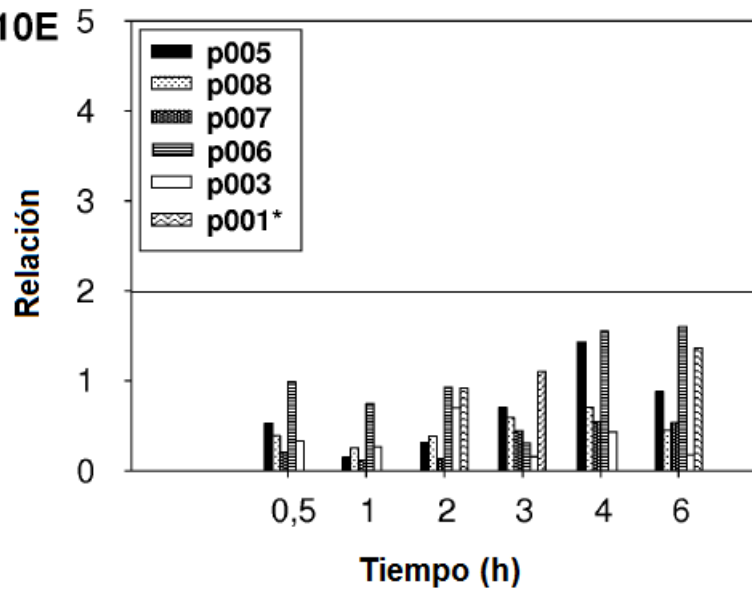
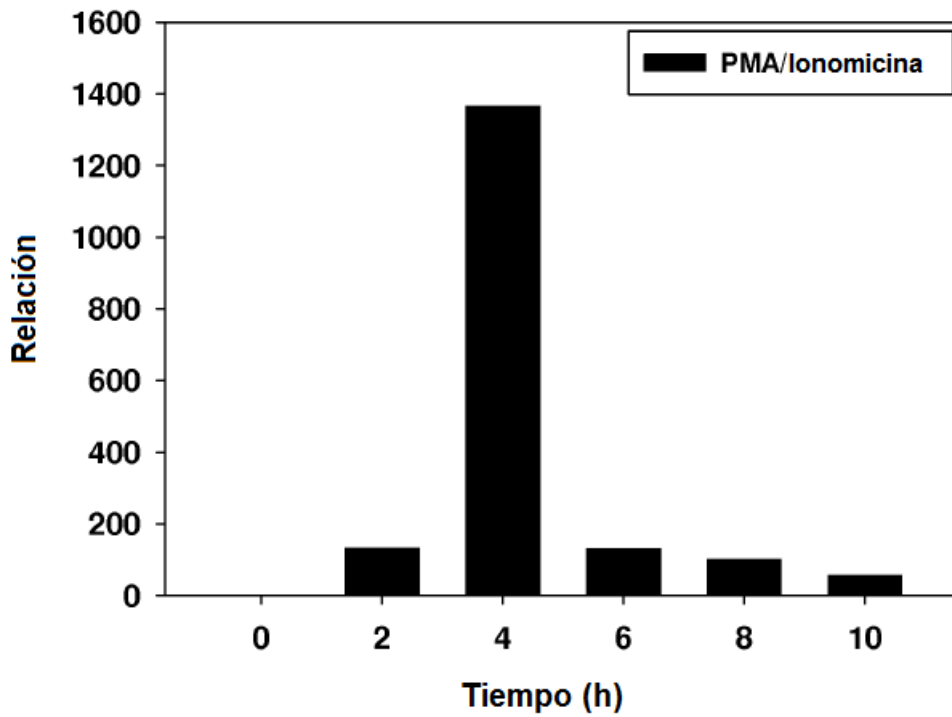
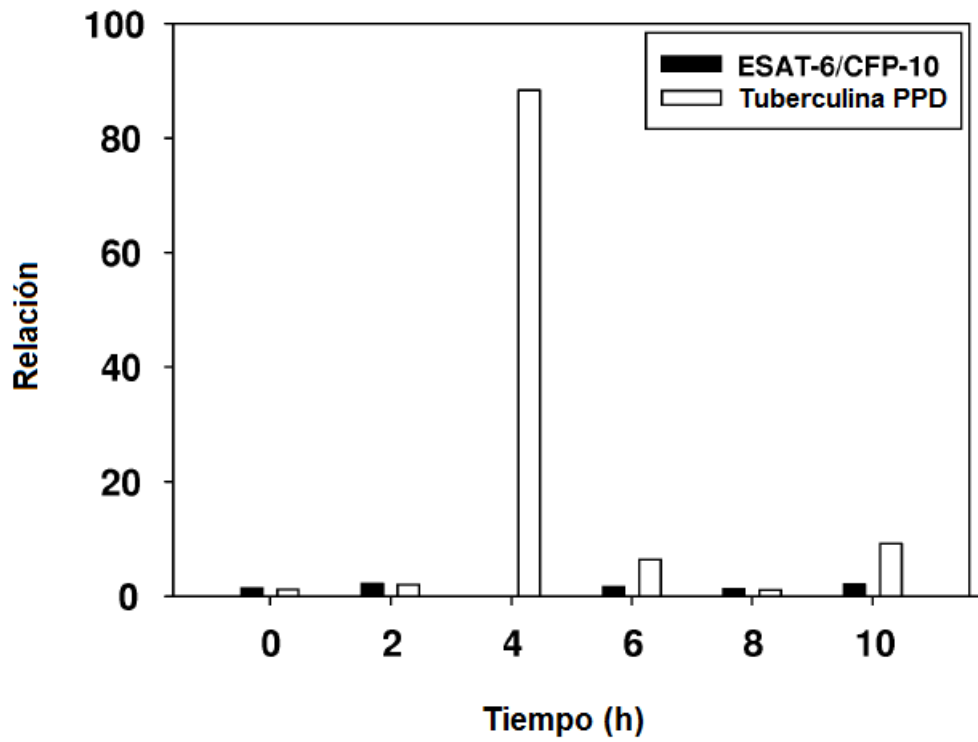
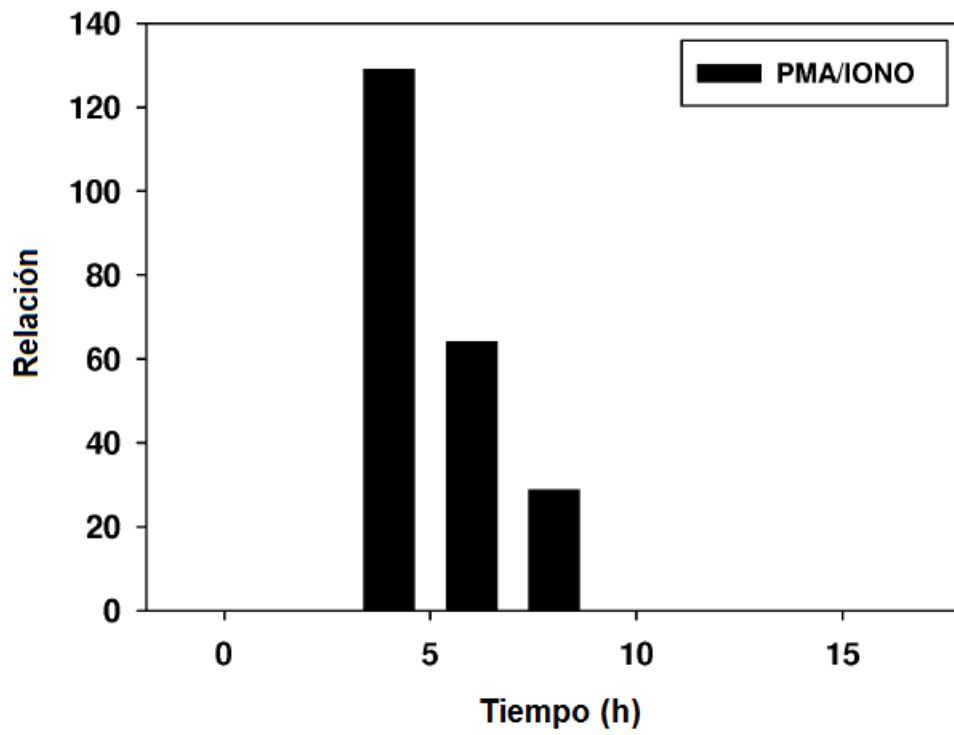
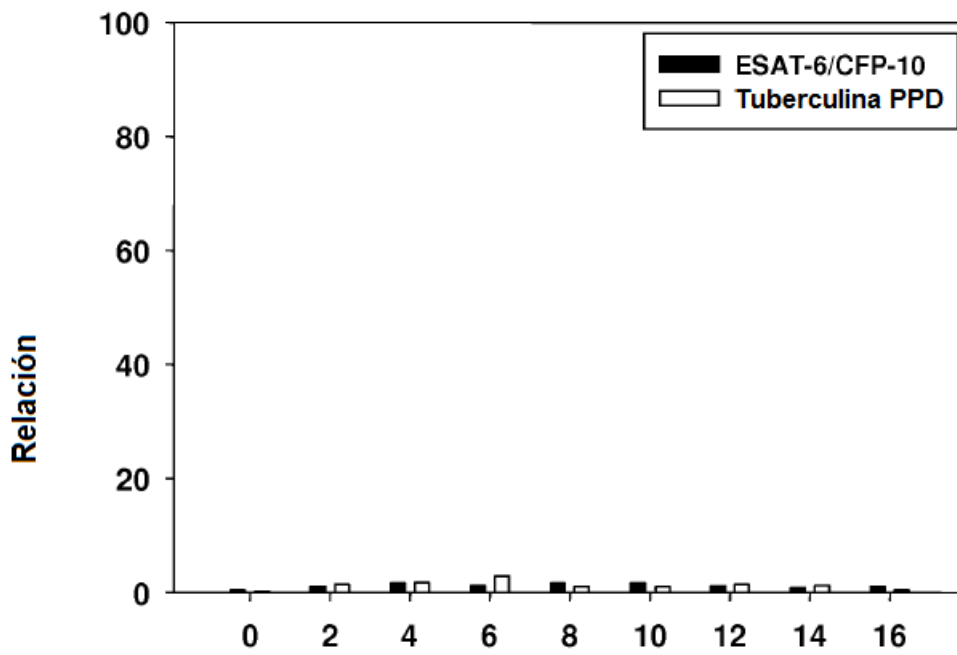


Fig. 11A



**Figura 11B**



**Figura 11 C**

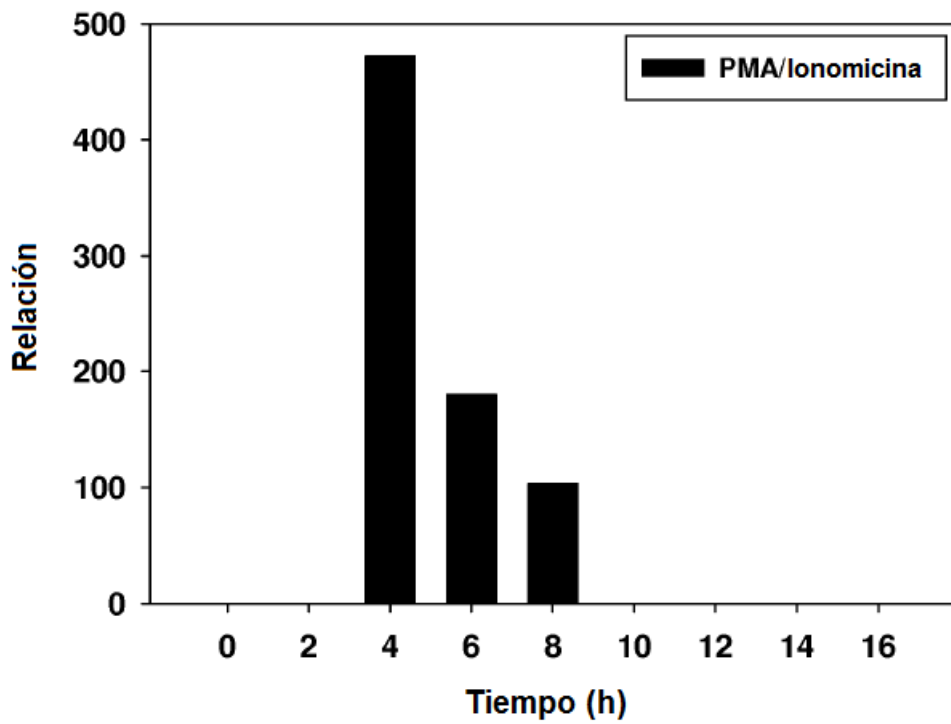
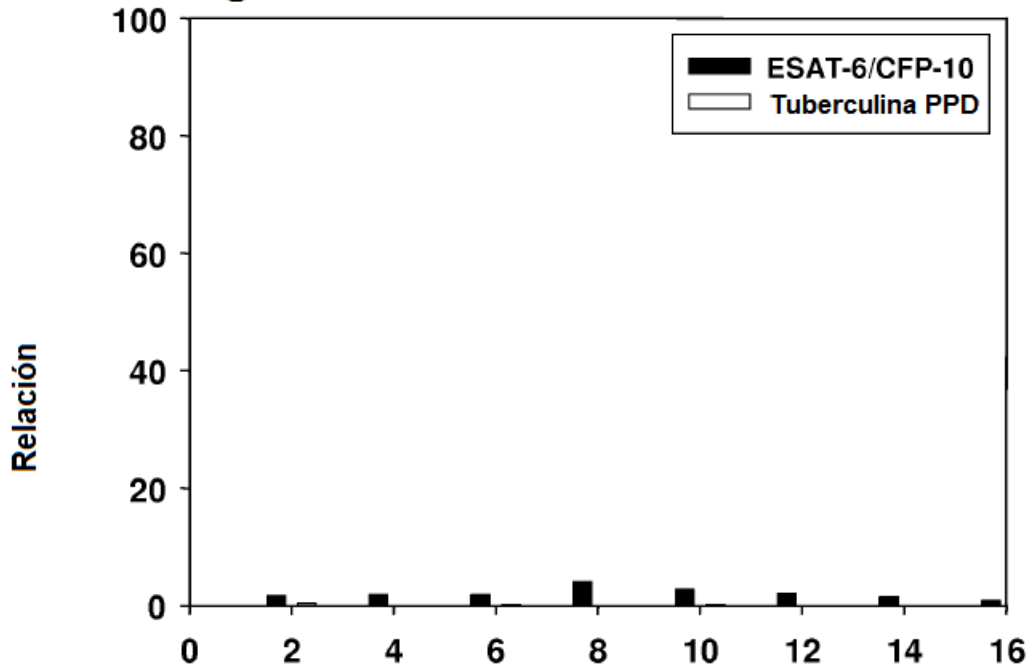




Fig. 12A

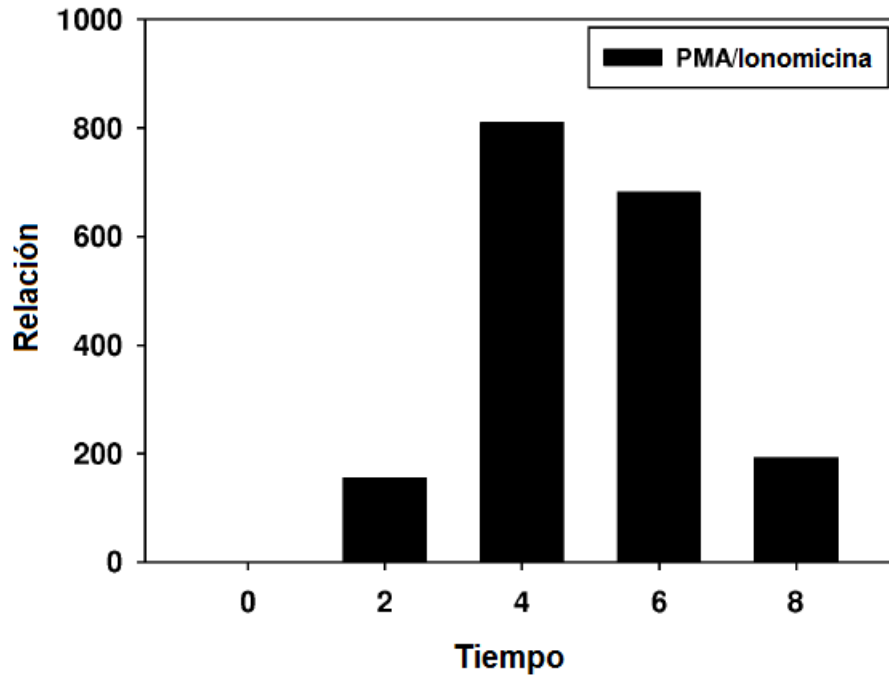
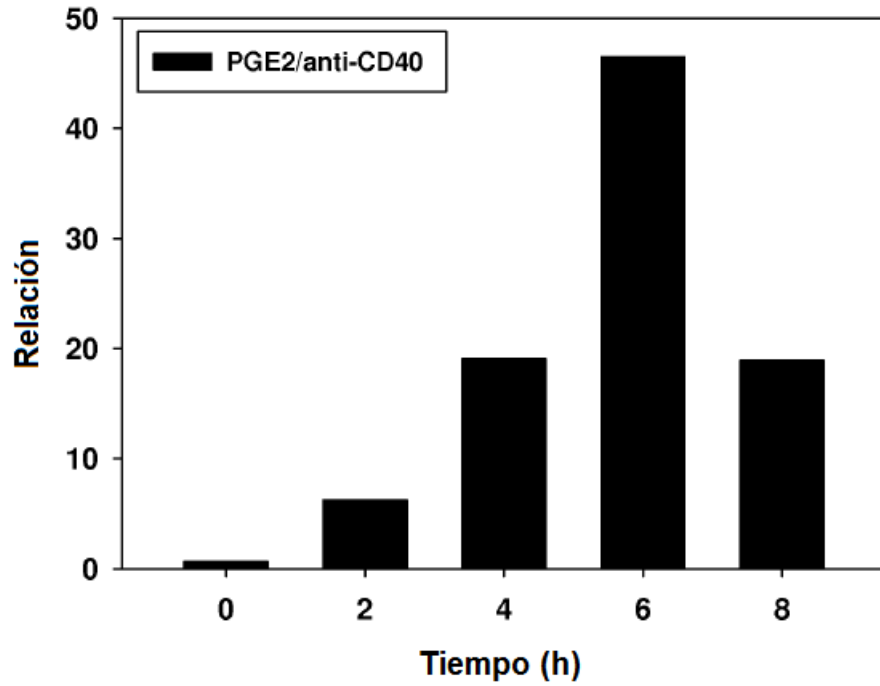


Fig. 12B



**Figura 13**

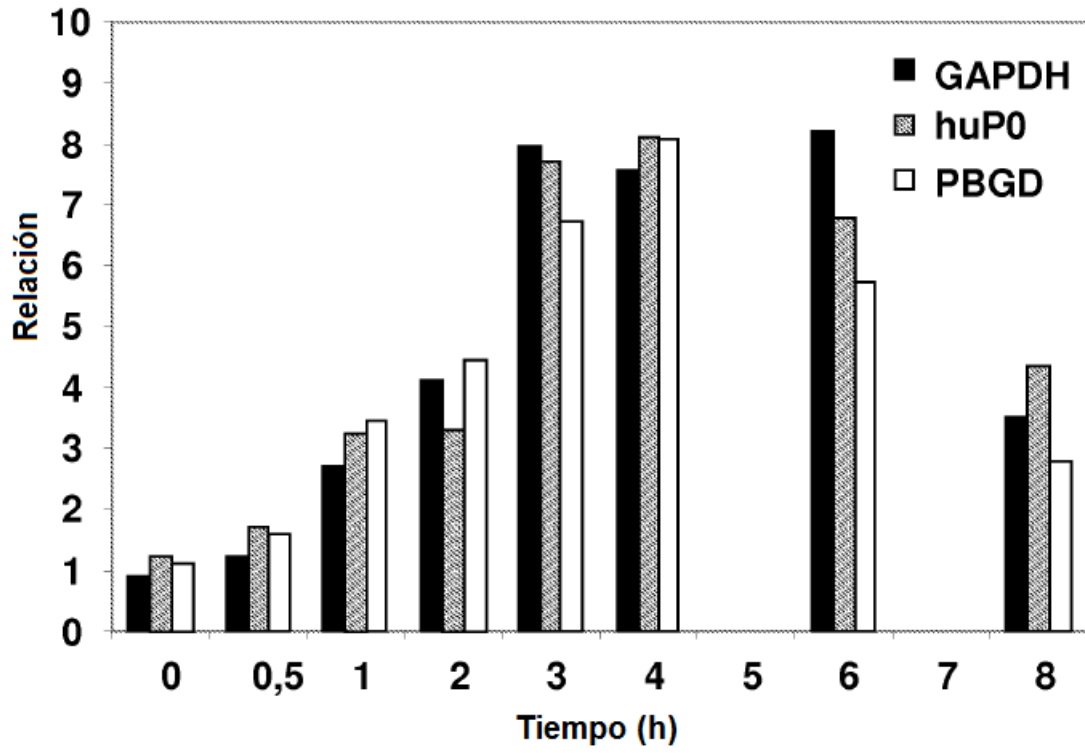


Figura 14

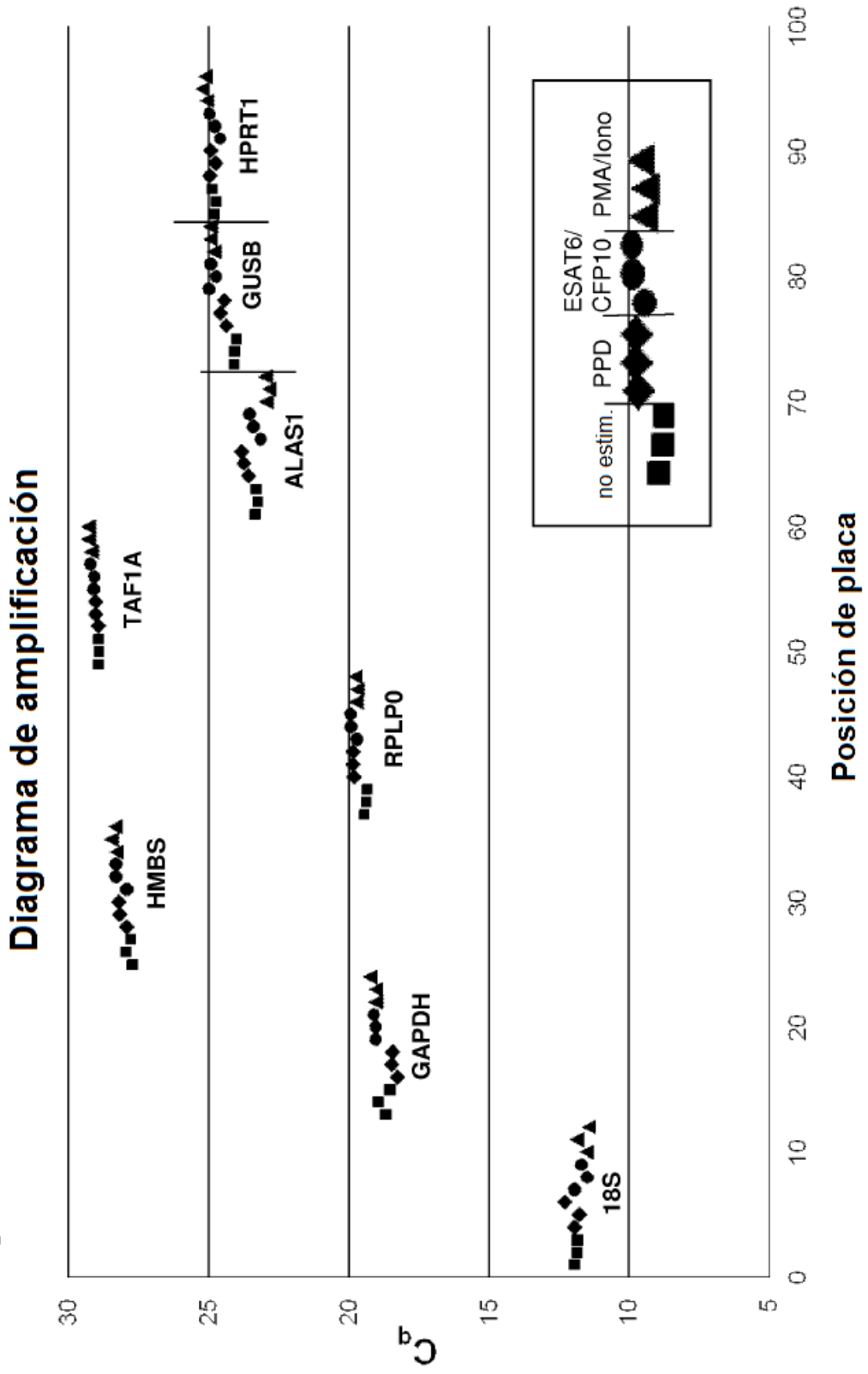


Figura 15

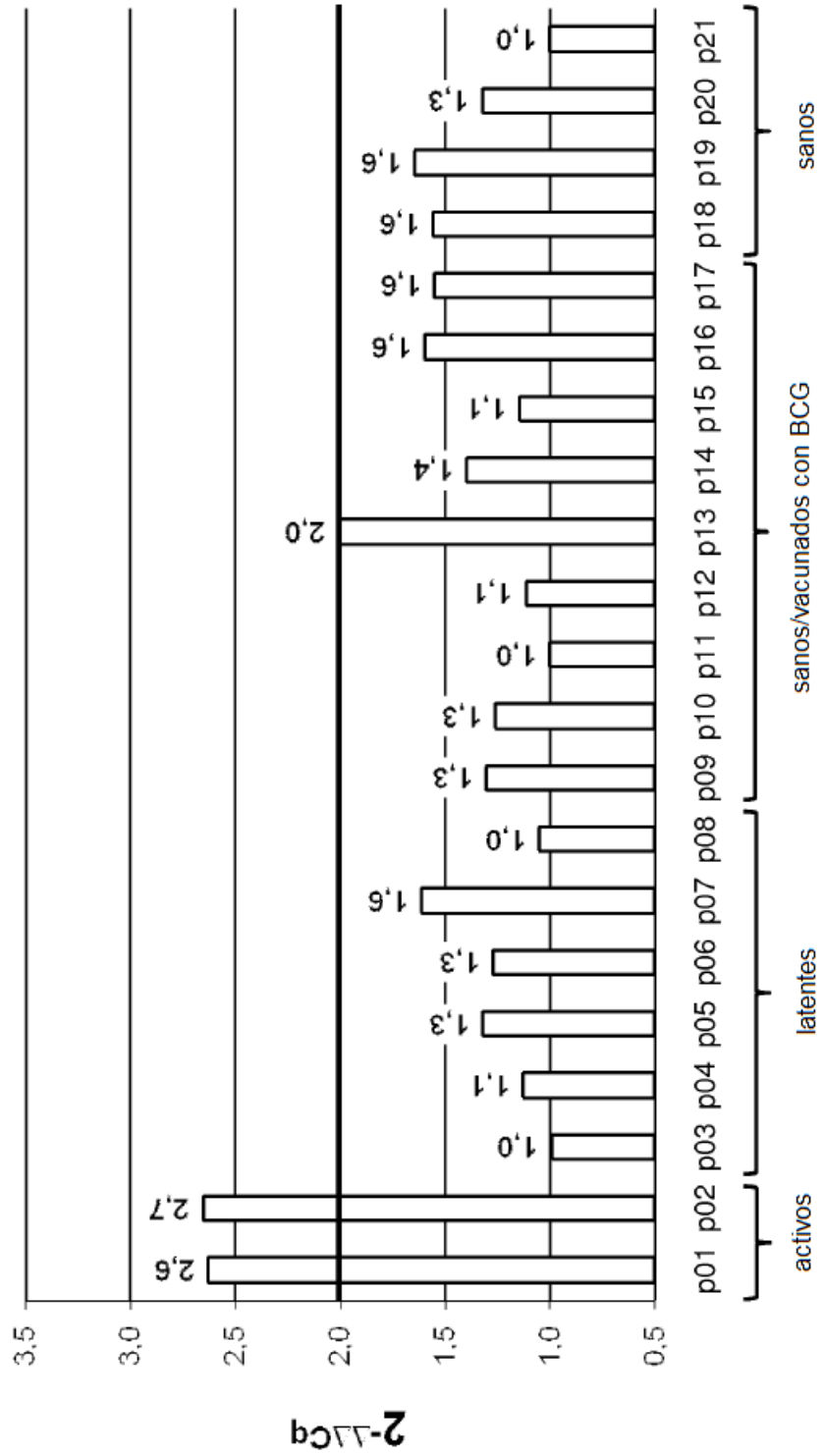


Figura 16

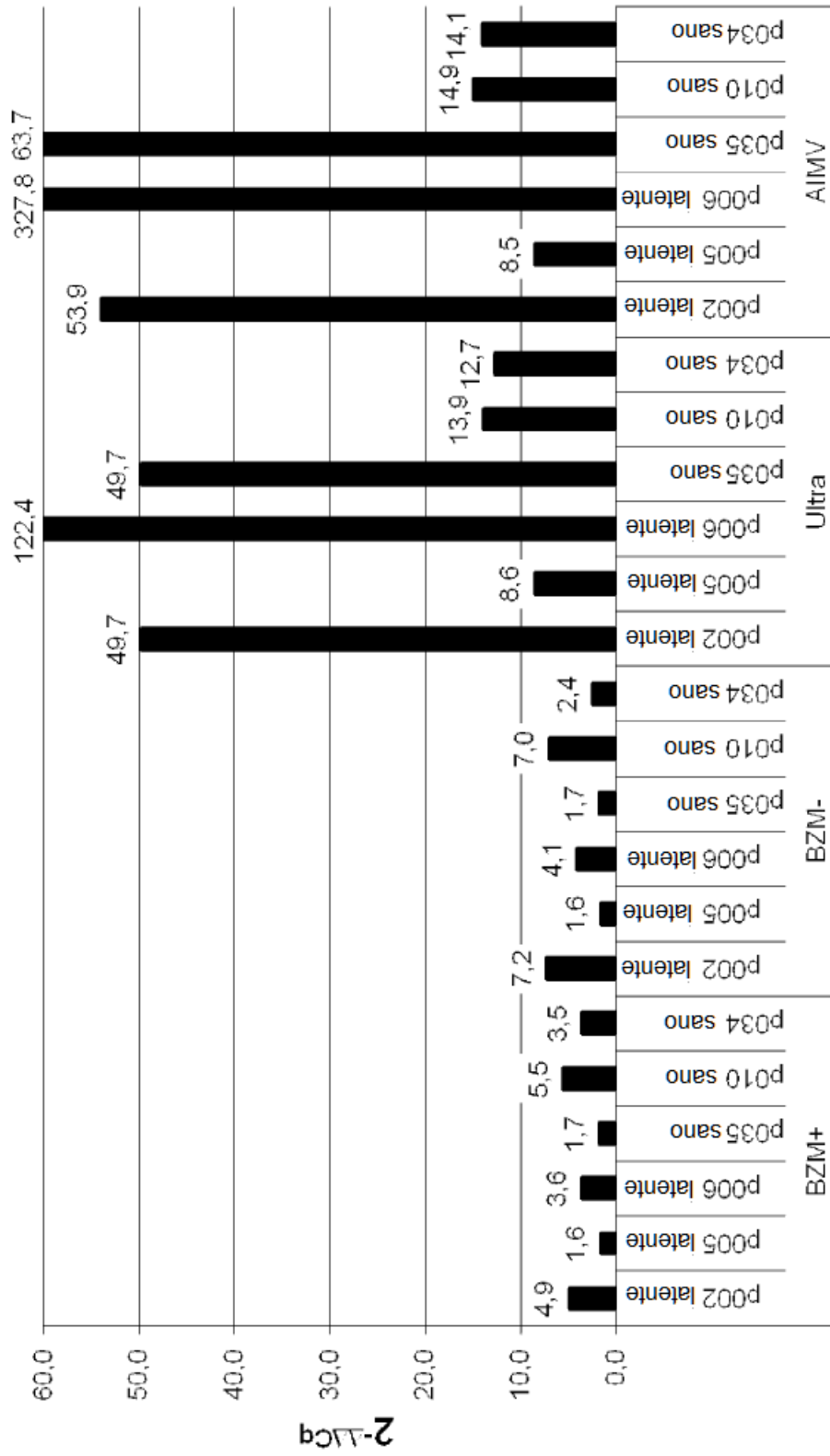


Figura 17

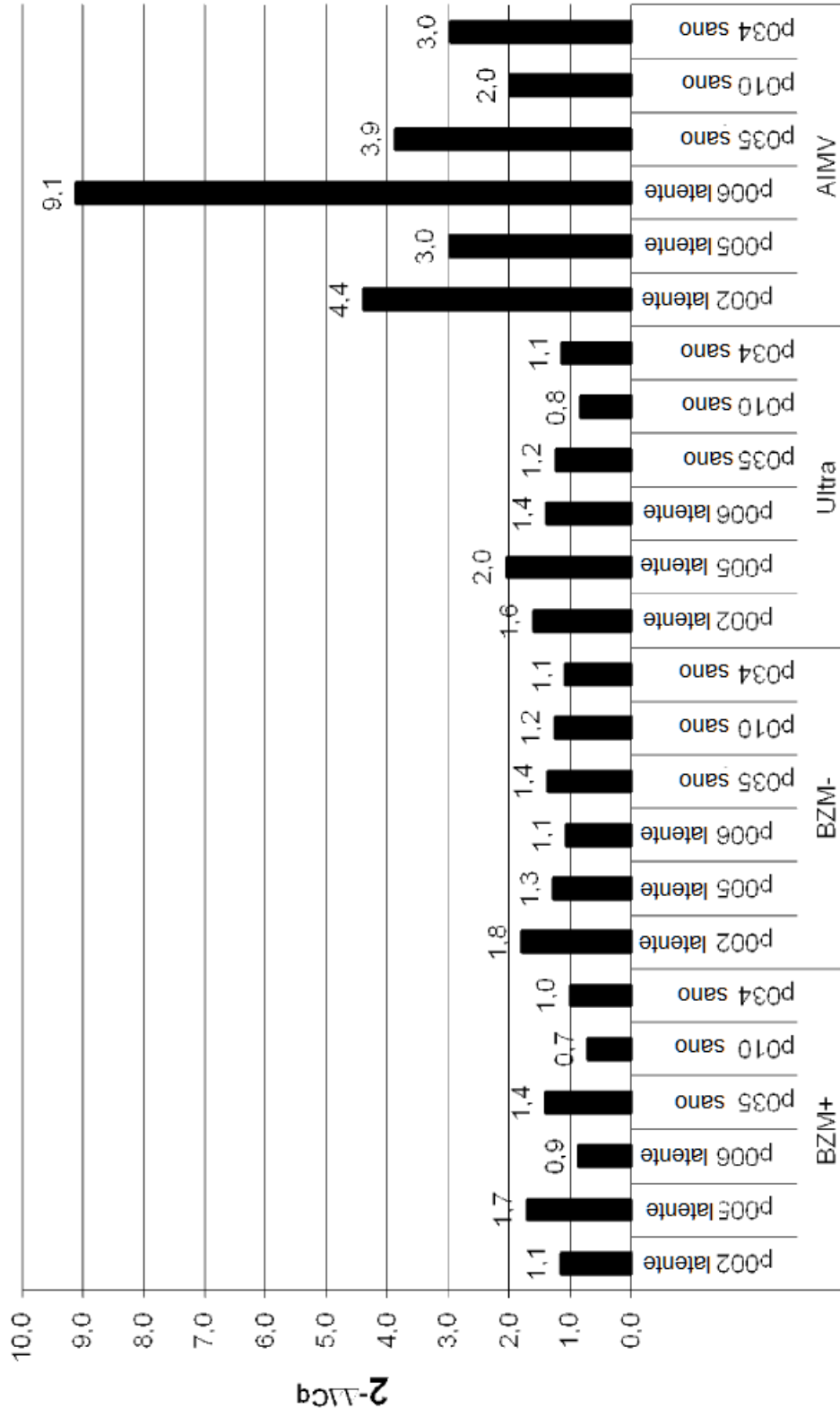


Figura 18

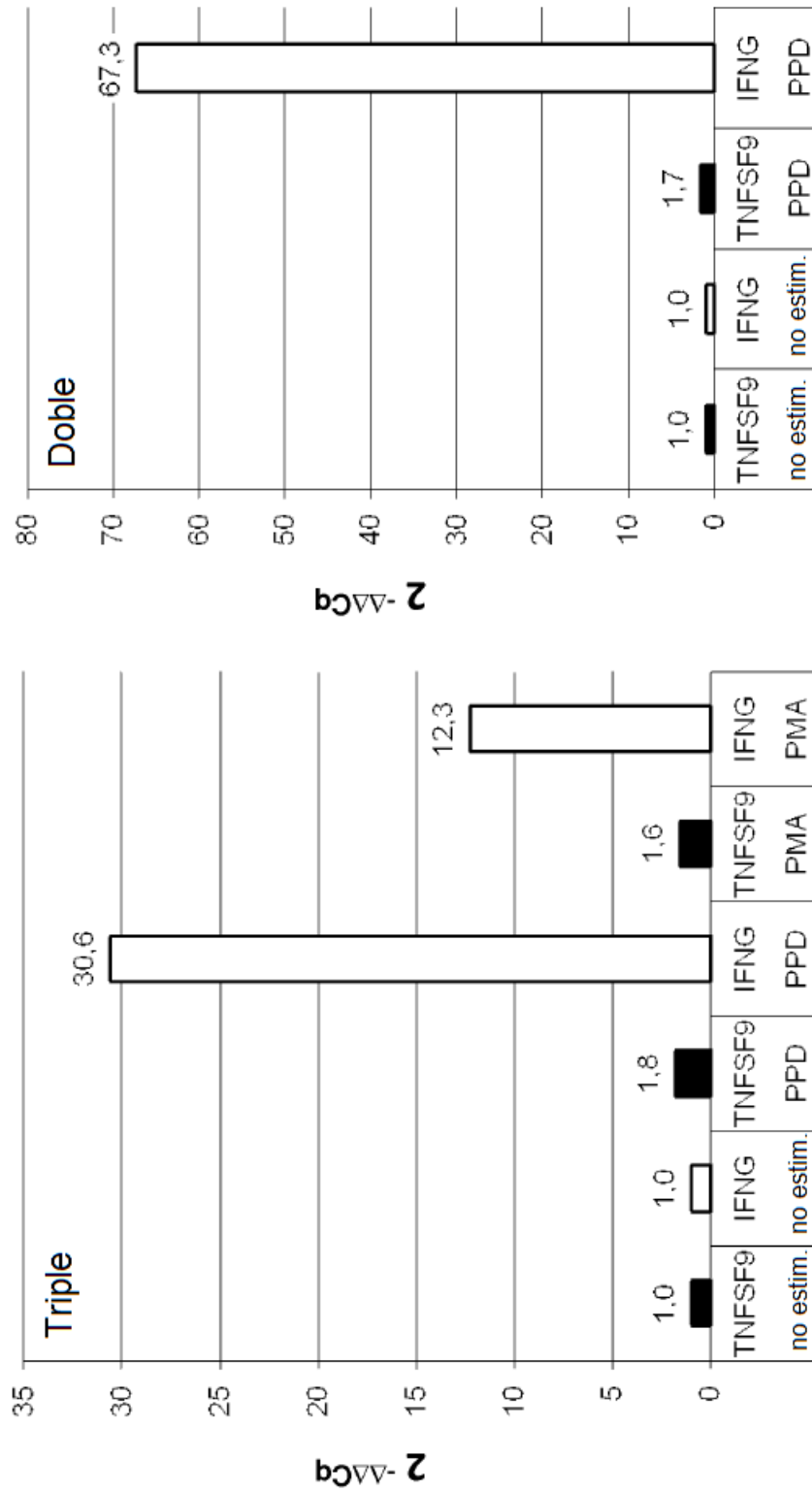


Figura 19

