

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 627**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2012 PCT/AU2012/000413**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12145786**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012 E 12777815 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2702165**

54 Título: **Un ensayo de la respuesta inmunitaria mediada por células**

30 Prioridad:

29.04.2011 US 201161480913 P

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

03.08.2017

73 Titular/es:

**CELLESTIS LIMITED (100.0%)
1341 Dandenong Road
Chadstone, Victoria 3148, AU**

72 Inventor/es:

**BOYLE, JEFF y
MANKTELOW, EMILY**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 628 627 T3

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

DESCRIPCIÓN

Un ensayo de la respuesta inmunitaria mediada por células

5 Esta descripción se refiere en general al campo de los ensayos de diagnóstico inmunológicos que incluyen un ensayo para medir la respuesta inmunitaria mediada por células. La presente descripción enseña la determinación del estado, la progresión y/o la gravedad de enfermedades basándose en la respuesta inmunitaria mediada por células de un sujeto. El ensayo contemplado en la presente memoria es capaz de integrarse en una arquitectura de patología estándar para proporcionar un sistema de informe de diagnóstico y facilitar el tratamiento clínico en el punto de asistencia.

Antecedentes

10 Los detalles bibliográficos de las publicaciones a las que hace referencia el autor en esta memoria descriptiva se recogen por orden alfabético al final de la descripción.

La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no es, y no se debería considerar, un reconocimiento o ninguna forma de sugerencia de que esta técnica anterior forme parte del conocimiento general común en ningún país.

15 Los ensayos de diagnóstico inmunológicos son herramientas importantes para detectar una diversidad de enfermedades. La eficacia de estos tipos de ensayos se basa en parte en la especificidad de los componentes en el sistema inmunitario. A pesar de esta especificidad, los diagnósticos inmunológicos no siempre son necesariamente lo suficientemente sensibles como para detectar niveles bajos de una actividad de respuesta inmunitaria innata y/o adaptativa, tal como en respuesta a una infección de bajo grado o en presencia de una infección persistente de bajo nivel o en sujetos con enfermedades activas o latentes. Existe la necesidad de desarrollar ensayos de diagnóstico con una sensibilidad incrementada con respecto a la respuesta inmunitaria mediada por células.

20 Una forma de ensayo de diagnóstico inmunológico implica la estimulación de células T con antígenos o mitógenos en un cultivo de células aisladas o en un cultivo de sangre completa, seguido de la detección de moléculas efectoras tales como las citocinas producidas por las células T estimuladas (también denominadas células T efectoras). Las moléculas efectoras se detectan en general mediante el uso de técnicas tales como inmunoensayos enzimáticos, análisis con microesferas multiplex, ELISpot y citometría de flujo. Tales ensayos son útiles para detectar respuestas de células T específicas de enfermedades. Un ejemplo de un ensayo de células T es QuantiFERON (marca registrada; Cellestis Limited). Más adelante en la presente memoria se denomina "QFT", y es un ensayo basado en un ensayo de liberación de interferón- γ (IFN- γ) (IGRA). Otro ensayo emplea la estimulación directa de células T humanas sumamente purificadas mediante el uso de anticuerpos anti-CD3 (un agonista de receptores de células T) y el agonista del receptor de tipo Toll (TLR), R848. Sin embargo, no se detectaron todas las moléculas efectoras, y el ensayo no es adecuado para sangre completa. Nowroozalazadeh *et al.* (Cytokine. junio de 2009;46(3):325-31) estudió la respuesta a estímulos del receptor de tipo Toll en infecciones por HIV-1 y HIV-2 mediante el uso de muestras de sangre completa. Fooladi *et al.* (Arch Med Sci, 2009; 5, 3:335-341) estudió la estimulación de células T y la liberación de citocinas inducida por la enterotoxina estafilocócica tipo B y monofosforil lípido A en esplenocitos aislados. El documento WO 2011/075773 describe un método para medir la actividad de la respuesta inmunitaria mediada por células en un sujeto, que comprende poner en contacto una muestra fuente de linfocitos del sujeto con uno o más agentes que potencian los sistemas inmunitarios adaptativo e innato, y medir la presencia o elevación del nivel de una molécula efectora inmunitaria de las células inmunitarias, en el que la presencia o el nivel de la molécula efectora inmunitaria es indicativo del nivel de la respuesta mediada por células del sujeto.

25 La capacidad de analizar rápidamente la inmunidad mediada por células y con un grado elevado de sensibilidad tiene importancia clínica. Un médico necesita tener una apreciación del desarrollo de una enfermedad y su efecto sobre el sistema inmunitario del hospedador.

30 Existe la necesidad, no obstante, de mejorar la sensibilidad de los ensayos de respuesta inmunitaria mediada por células en un sujeto.

Sumario

35 En la presente memoria se describen métodos para detectar una respuesta inmunitaria mediada por células en un sujeto, y tales métodos comprenden incubar linfocitos del sujeto con:

- (i) un antígeno; y
- 50 (ii) una cantidad limitante de un agonista de receptor de tipo Toll (TLR);

y después cribar con respecto a los niveles de moléculas efectoras producidas por los linfocitos activados. Una "cantidad limitante" del agonista de TLR significa una cantidad de agente que induce una mínima respuesta de fondo cuando el agente se incuba con linfocitos en ausencia de un antígeno.

La coincubación del antígeno y la cantidad limitante de agonista de TLR con linfocitos puede dar como resultado un

ensayo más sensible, lo que permite una detección más temprana de la estimulación de los linfocitos que la que sería posible de otra manera. La sensibilidad incrementada puede incluir una detección incrementada al menos un 10% de las moléculas efectoras en comparación con la coincubación con cantidades no limitantes del agonista de TLR. La capacidad de incrementar la sensibilidad de un ensayo de la respuesta inmunitaria mediada por células también puede posibilitar medios de detección menos sensibles de moléculas efectoras. Además, la magnitud de la respuesta inmunitaria mediada por células detectada en el ensayo se puede correlacionar con el estado, la progresión y/o la gravedad de la enfermedad.

La invención se refiere a un método para medir la actividad de la respuesta inmunitaria mediada por células en un sujeto, y dicho método comprende poner en contacto linfocitos de una muestra de sangre obtenida del sujeto con un antígeno y un agonista R848 del receptor de tipo Toll (TLR) 7/8 a una concentración de 0,01 µg/ml a 0,1 µg/ml y medir la presencia o elevación del nivel de interferón-γ (IFN-γ) de los linfocitos, en el que la presencia o el nivel de IFN-γ es indicativo del nivel de respuesta mediada por células del sujeto.

De manera provechosa, el sujeto es un ser humano y la muestra es sangre completa sin diluir. De manera alternativa, la muestra es sangre completa que comprende de alrededor del 10% al 100% en volumen de la muestra a ensayar, o que comprende de alrededor del 50% al 100% en volumen de la muestra a ensayar, o que comprende de alrededor del 80% al 100% en volumen de la muestra a ensayar. El volumen de muestra puede estar en cantidades de microlitros o mililitros, tal como de 0,5 µl a 5 ml. De manera conveniente, la sangre completa se recoge en un tubo que comprende heparina, y la molécula efectora inmunitaria es IFN-γ. En general, los efectores inmunitarios se detectan con anticuerpos específicos para los mismos, tal como mediante el uso de ELISA o un ELISpot.

El sujeto puede tener una infección por un agente patógeno seleccionado del género *Mycobacterium*, tal como *Mycobacterium tuberculosis* o tuberculosis (TB), género *Staphylococcus*, género *Streptococcus*, género *Borrelia*, *Escherichia coli*, género *Salmonella*, género *Clostridium*, género *Shigella*, género *Proteus*, género *Bacillus*, virus Herpes, virus de la Hepatitis B o C y virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), o una enfermedad que resulta de ellas.

El sujeto puede tener de manera alternativa una enfermedad seleccionada de enfermedad celiaca, diabetes autoinmunitaria, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, esclerosis múltiple, enfermedad autoinmunitaria de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, enfermedad de Behcet, penfigoide ampuloso, cardiomiopatía, celiaquía-dermatitis, síndrome de fatiga crónica (CFIDS), desmielinización inflamatoria crónica, polineuropatía inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad por crioglobulinas, enfermedad de Crohn, dermatitis herpetiforme, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, diabetes dependiente de insulina (Tipo I), liquen plano, lupus, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, miastenia gravis, miocarditis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitíligo y enfermedad inflamatoria intestinal.

El sujeto puede tener de manera alternativa un cáncer seleccionado del protooncogén ABL1, cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenoquístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnógénica, alopecia, sarcoma alveolar de partes blandas, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres óseos, cáncer intestinal, glioma del tronco encefálico, tumores cerebrales y del SNC, cáncer de mama, tumores del SNC, tumores carcinoideos, cáncer de cuello uterino, tumores cerebrales infantiles, cáncer infantil, leucemia infantil, sarcoma infantil de tejidos blandos, condrosarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cánceres colorrectales, linfoma de células T cutáneas, dermatofibrosarcoma protuberans, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de vías biliares extrahepáticas, cáncer de ojo, melanoma ocular, retinoblastoma, cáncer de trompas de Falopio, anemia de Fanconi, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor carcinoide gastrointestinal, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, neoplasias malignas hematológicas, leucemia de células peludas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, papilomavirus humano, mola hidatiforme, hipercalcemia, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, cáncer de células de islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer laríngeo, leiomiomasarcoma, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labio, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide maligno de riñón, meduloblastoma, melanoma, cáncer de células de Merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cánceres de boca, neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, mieloma, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo,

nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de Nijmegen, cáncer de piel distinto de melanoma, cáncer de pulmón de células no microcíticas (NSCLC), cánceres oculares, cáncer esofágico, cáncer de la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer ovárico con ostomía, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer de glándula parótida, cáncer de pene, tumores neuroectodérmicos periféricos, cáncer de hipófisis, policitemia vera, cáncer de próstata, cánceres infrecuentes y trastornos asociados, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, síndrome de Rothmund-Thomson, cáncer de glándula salival, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células microcíticas (SCLC), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, tumores de la médula espinal, carcinoma de células escamosas (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición (vejiga), cáncer de células de transición (pelvis renal/uréter), cáncer trofoblástico, cáncer uretral, cáncer del aparato urinario, uroplaquinas, sarcoma uterino, cáncer de útero, cáncer vaginal, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilms.

El sujeto puede estar expuesto de manera alternativa a un agente tóxico.

En los aspectos anteriores, el antígeno puede derivar del agente patógeno, estar asociado a la enfermedad o cáncer, o ser el agente tóxico. De manera alternativa, la infección, enfermedad, cáncer o agente tóxico puede inhibir la inmunidad mediada por células, en cuyo caso se podría emplear cualquier antígeno al que el sujeto se haya expuesto anteriormente.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación gráfica que muestra las respuestas de IFN- γ de cultivos de sangre completa expuestos a diferentes concentraciones del agonista de TLR, R848 (0,01 $\mu\text{g/ml}$ a 0,1 $\mu\text{g/ml}$). El experimento se llevó a cabo en tubos sin antígeno (antígeno Nil) que comprendían R848 y la muestra de sangre. Los tubos son tubos QFT-antígeno Nil.

La Figura 2 es una representación gráfica de las respuestas de IFN- γ de cultivos de sangre completa expuestos a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de virus de Epstein-Barr (EBV) y concentraciones variables de R848 (0,01 $\mu\text{g/ml}$, 0,05 $\mu\text{g/ml}$ y 0,1 $\mu\text{g/ml}$).

La Figura 3 es una representación gráfica de las respuestas de IFN- γ de cultivos de sangre completa expuestos a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de citomegalovirus (CMV) y concentraciones variables de R848 (0,05 $\mu\text{g/ml}$ y 0,1 $\mu\text{g/ml}$).

La Figura 4 es una representación gráfica de las respuestas de IFN- γ de cultivos de sangre completa de pacientes que se sospechaba que tenían tuberculosis o sus contactos domésticos mediante el uso de QFT en presencia de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ o 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de R848. Cada punto de datos representa la respuesta menos el fondo respectivo (Nil; Nil + 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de R848; y N + 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de R848, respectivamente). Los datos se transformaron en el logaritmo y se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas con una prueba de Bonferroni. Las barras indican el valor medio con EEM.

Descripción detallada

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento o número entero o etapa de método o grupo de elementos o números enteros o etapas de métodos indicadas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o etapa de método o grupo de elementos o números enteros o etapas de métodos.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, las formas singulares "un", "uno/una" y "el/la" incluyen los aspectos plurales, a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula T" incluye una célula T individual, así como dos o más células T; la referencia a "un agente" incluye un único agente, así como dos o más agentes; la referencia a "la descripción" incluye aspectos individuales o múltiples enseñados por la presente descripción; y así sucesivamente. Las expresiones "células T" y "linfocitos T" se usan de manera intercambiable en la presente memoria. Una "célula inmunitaria" incluye un linfocito, tal como las células NK.

La referencia a un "agente", "reactivo", "molécula" y "compuesto" incluye las entidades individuales y las combinaciones de dos o más de tales entidades. Una "combinación" también incluye múltiples partes, tales como una composición de dos partes en la que los agentes se proporcionan por separado y se usan o se dispensan por separado o se mezclan entre sí antes de la dispensación. Por ejemplo, un envase de un ensayo de múltiples partes puede tener un antígeno contra el que se va a medir una respuesta inmunitaria mediada por células y un agonista de TLR. Este aspecto de la presente descripción incluye agentes secados y sueltos o inmovilizados en una pared de un compartimento o soporte sólido en un envase de ensayo.

Los linfocitos se activan mediante la coincubación con el antígeno. Las cantidades limitantes de agonista de TLR aumentan la detección temprana de las moléculas efectoras.

La expresión "agonista de TLR" es un ejemplo de un agente que potencia el sistema inmunitario innato. Otros términos adecuados incluyen los potenciadores, estimulantes, activadores e inductores del sistema inmunitario

innato.

Un estimulante de la inmunidad innata incluye un agonista de TLR. Los agonistas de TLR incluyen un compuesto de imidazoquinolina tal como R848 (ligando de TLR-7/8), Pam3CSK4 (ligando de TLR-2), Lipomanano (ligando de TLR-2), poli(I:C) [ligando de TLR-3], Lipopolisacárido (ligando de TLR-4), y oligodesoxinucleótidos de CpG (ligando de TLR-9). Con respecto a la selección de un agonista de TLR, en orden decreciente, los agonistas se seleccionan de agonistas para TLR-7/8 > TLR-4 > TLR-3 > TLR-2.

R848 se describe en Nowroozalazadeh *et al.* (2009) *Cytokine* 46:325-31, Hemmi *et al.* (2002) *Nature Immunology* 3:196-200 y Peel *et al.* (1985) *J Med Chem* 28:298-302. La referencia a "imidazoquinolina" incluye un derivado de imidazoquinolina.

La presente descripción enseña el aumento de la producción de moléculas efectoras por parte de los linfocitos expuestos a un antígeno. Tales linfocitos son linfocitos "activados" o "estimulados". El aumento se da exponiendo a las células a una cantidad limitante de un agonista de TLR. El nivel de la respuesta es mayor en presencia del antígeno y de cantidades limitantes del agonista de TLR que la suma de las respuestas por separado en presencia del antígeno o de cantidades limitantes del agonista de TLR solo, o cuando el agonista de TLR no es limitante. Esto posibilita un ensayo más sensible para analizar la respuesta inmunitaria mediada por células de un sujeto. La presente descripción, por lo tanto, posibilita un ensayo para detectar, analizar o de otra manera monitorizar una respuesta mediada por células en un sujeto midiendo la presencia o el nivel de las moléculas efectoras de las células T estimuladas mediante un antígeno en presencia de un agonista de TLR pero en cantidades limitantes. El ensayo también posibilita la detección más temprana de la respuesta mediada por células. El ensayo enseñado en la presente memoria puede aumentar la sensibilidad de un ensayo mediado por células, lo que puede posibilitar que se empleen ensayos de detección menos sensibles. Además, se propone que el grado o magnitud de la respuesta inmunitaria mediada por células refleja o informa del estado, la progresión y/o la gravedad de una enfermedad. Por ejemplo, la magnitud de la respuesta puede determinar si un sujeto tiene una infección o enfermedad latente, activa o aguda.

También se puede añadir un agente adicional para modular la actividad de las células T reguladoras (células T-reg). Lo último abarca inhibir la función inhibidora de las células T-reg. Los agentes que modulan las células T-reg abarcados en la presente memoria incluyen un ligando de CD25; un oligonucleótido directo o inverso hacia el material genético que codifica JAK1 o TYK2; un anticuerpo neutralizante; un oligonucleótido que contiene CpG; un oligonucleótido que actúa como un agente modulador de TLR; y otros agentes moduladores de TLR.

En una realización particular, las células T-reg son células inhibidoras de la respuesta inmunitaria cuya actividad se inhibe.

Una "molécula de CpG" significa un oligonucleótido que comprende una secuencia o motivo de CpG.

Las cantidades del agonista de TLR usadas en un ensayo descrito en la presente memoria variarán dependiendo del agonista y de las condiciones del ensayo y de las concentraciones del antígeno y de otros componentes. Con respecto a R848, el agonista de TLR-7/8 de la invención, una cantidad limitante de este agonista de TLR incluye de 0,01 µg/ml a 0,1 µg/ml de líquido de ensayo. Esto abarca 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 y 0,1 µg/ml.

La presente descripción proporciona un medio para determinar la respuesta de la inmunidad mediada por células en un sujeto y, a su vez, enseña la determinación de si una enfermedad o un agente induce o está asociado a inmunodepresión. El método también posibilita el diagnóstico de enfermedades infecciosas, estados patológicos, la determinación del nivel de inmunocompetencia y el análisis de la respuesta de las células inmunitarias hacia agentes endógenos o exógenos, así como el análisis de la exposición a un agente tóxico tal como berilio u otros agentes tóxicos. El ensayo también posibilita el cribado de sujetos expuestos previamente a un antígeno particular, tal como un antígeno asociado a una enfermedad, infección o contaminante.

En la presente memoria se contempla un método para medir la actividad de la respuesta inmunitaria mediada por células en un sujeto, y el método comprende poner en contacto linfocitos del sujeto con un antígeno y una cantidad limitante de un agonista de TLR y medir la elevación del nivel de una molécula efectora inmunitaria de las células inmunitarias, en el que el nivel de la molécula efectora inmunitaria es indicativo del nivel de la respuesta mediada por células del sujeto, en el que el nivel de la respuesta es indicativo de la presencia o ausencia o nivel o etapa de una enfermedad o afección seleccionada de la lista que comprende una infección por un agente patógeno, una enfermedad autoinmunitaria, un cáncer, una afección inflamatoria y la exposición a un agente tóxico.

La presente descripción contempla además un método para determinar si un agente induce inmunodepresión en un sujeto, y el método comprende poner en contacto los linfocitos del sujeto tras la exposición al agente con un antígeno y una cantidad limitante de un agonista de TLR, y medir la presencia y el nivel de una molécula efectora de los linfocitos, en el que el nivel de la molécula efectora determina el nivel de la inmunodepresión inducida por el agente. El agente puede ser un medicamento o un agente tóxico ambiental.

De acuerdo con la invención, los linfocitos se hallan en una muestra de sangre. La muestra de sangre se co-estimula

con un antígeno y una cantidad limitante de R848, concretamente de 0,01 µg/ml a 0,1 µg/ml de R848.

De manera específica, la invención se refiere a un método para medir la actividad de la respuesta inmunitaria mediada por células en un sujeto, y dicho método comprende poner en contacto linfocitos de una muestra de sangre obtenida del sujeto con un antígeno y un agonista R848 del receptor de tipo Toll (TLR) 7/8 a una concentración de 0,01 µg/ml a 0,1 µg/ml y medir la presencia o elevación del nivel de interferón-γ (IFN-γ) de los linfocitos, en el que la presencia o el nivel de IFN-γ es indicativo del nivel de respuesta mediada por células del sujeto.

Este método se puede usar para detectar o monitorizar la presencia, ausencia, nivel o etapa de una enfermedad o afección, tal como una infección por un agente patógeno, una enfermedad autoinmunitaria, un cáncer, una afección inflamatoria y/o la exposición a un medicamento o a un agente tóxico tal como berilio u otro agente tóxico ambiental.

La referencia a un "sujeto" incluye un ser humano o una especie no humana, que incluye primates, ganado (p.ej. ovejas, vacas, cerdos, caballos, asnos, cabras), animales de experimentación en laboratorio (p.ej. ratones, ratas, conejos, conejillos de indias, hámsters), animales de compañía (p.ej. perros, gatos), especies aviares (p.ej. aves de corral, aves de aviario), reptiles y anfibios. La presente materia tiene aplicabilidad en la medicina humana, así como aplicaciones en ganadería y veterinaria y animales salvajes, lo que incluye las industrias de carreras de caballos, perros y camellos. Por ejemplo, el ensayo de la presente descripción se puede llevar a cabo de manera rutinaria en caballos antes y/o después de un esfuerzo intenso (tal como una carrera) para cribar en busca de indicios de hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio (HPIE). Todos los caballos exhiben cierta forma de HPIE hasta cierto punto durante el ejercicio. Sin embargo, las formas subclínicas de HPIE pueden ser difíciles de detectar.

La referencia a un "ser humano" incluye las poblaciones particulares de seres humanos, tales como las poblaciones pediátricas, ancianas y enfermas de seres humanos, así como cohortes o poblaciones particulares de seres humanos de un grupo étnico particular.

En otra realización, el sujeto es un ser humano y el ensayo de respuesta inmunitaria mediada por células se usa en el cribado con respecto a la respuesta a microorganismos, virus y parásitos patógenos, la posibilidad de desarrollar o monitorizar afecciones autoinmunitarias, la enfermedad celíaca, monitorizar la respuesta de un sujeto a la exposición oncológica, y para determinar la presencia de cualquier inmunodeficiencia o inmunodepresión. Esto último puede ocurrir, por ejemplo, debido a ciertos medicamentos, que incluyen diversos agentes quimioterápicos. De manera alternativa, la exposición a contaminantes y agentes tóxicos ambientales.

La expresión "moléculas efectoras inmunitarias" comprende una variedad de moléculas que se producen en respuesta a la activación o estimulación celular por un antígeno. IFN-γ es una molécula efectora inmunitaria especialmente útil que se usa de acuerdo con la invención. Otras incluyen una diversidad de citocinas, tales como las interleucinas (IL), p.ej. IL-2, IL-4, IL-6, IL-6 (CXCL8), IL-10, IL-12, IL-13, IL-16 (LCF) o IL-17, IL-1α (IL-1F1), IL-1β (IL-1F2), IL-1ra (IL-1F3), Factor de Necrosis tumoral alfa (TNF-α), factor de crecimiento transformador beta (TGF-β), un factor estimulante de colonias (CSF) tal como de granulocitos (G)-CSF o de granulocitos-macrófagos (GM)-CSF, el componente del complemento 5a (C5a), Groα (CXCL1), sICAM-1 (CD54), IP-10 (CXCL10), I-TAC (CXCL11), MCP-1 (CCL2), MIF (GIF), MIP-1α (CCL3), MIP-1β (CCL4), RANTES (CCL5) o MIG (CXCL9).

El ensayo enseñado en la presente memoria posibilita la detección de la presencia o ausencia o nivel o etapa de una enfermedad o afección en un sujeto, tal como la infección por un agente patógeno, una enfermedad autoinmunitaria, cáncer, la exposición a un agente inflamatorio o la exposición a un medicamento, la exposición a un agente tóxico tal como berilio u otro agente tóxico o contaminante, y una inmunodeficiencia o inmunodepresión, tal como la inducida por una enfermedad.

El agonista de TLR puede estar libre en un recipiente de reacción o puede estar inmovilizado en un soporte sólido, tal como en una microesfera o en el lado o el fondo de un recipiente de reacción. El agonista puede estar también en forma seca, que se reconstituye antes o durante el uso. De forma similar, el antígeno puede estar libre o inmovilizado en un recipiente de reacción, tal como en el recipiente propiamente dicho o en una microesfera u otro soporte sólido.

La muestra recogida del sujeto se deposita en general en un tubo de recogida de sangre. Un tubo de recogida de sangre incluye un tubo de extracción de sangre u otro recipiente similar. De manera conveniente, cuando la muestra es sangre completa, el tubo de recogida de sangre está heparinizado. De manera alternativa, se añade heparina al tubo después de recoger la sangre. La sangre completa es una muestra muy adecuada. La referencia a "sangre completa" incluye la sangre completa que no se ha diluido, tal como en un cultivo de tejidos, medio, reactivos, excipientes, etc. En una realización, la expresión "sangre completa" incluye una muestra de ensayo (es decir, mezcla de reacción) que comprende al menos un 10% en volumen de sangre completa. La expresión "al menos un 10% en volumen" incluye volúmenes de sangre del 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100% en volumen del volumen total de ensayo de la mezcla de reacción. Se pueden añadir agentes adicionales tales como medios de cultivo, enzimas, excipientes, antígeno y similares, sin apartarse de la muestra que comprende "sangre completa".

Los volúmenes de sangre pueden ser de alrededor de 0,5 µl a 200 ml. Los ejemplos incluyen 0,5 µl, 1 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl, 50 µl, 100 µl, 500 µl, 1 ml, 5 ml, 10 ml, y 20 ml. La presente descripción también posibilita el uso del microflujo acústico para mejorar la mezcla de los componentes en el ensayo. El microflujo acústico se describe en la solicitud de patente internacional N° PCT/AU01/00420 y en Petkovic-Duran *et al.* (2009) *Biotechniques* 47:827-834.

5 En la presente memoria se contempla un método de mezcla de uno o más linfocitos y un antígeno y una cantidad limitante de un agonista de TLR en un recipiente, y el método comprende proporcionar de alrededor de 0,5 µl a 150 µl de fluido que comprende los componentes en el recipiente para establecer una discontinuidad en la impedancia acústica, y aplicar una señal acústica para provocar la mezcla dentro del fluido. También se puede aplicar una
10 segunda señal acústica, y la primera y segunda señal tienen frecuencias respectivas seleccionadas cada una de alrededor de 1 Hz a alrededor de 20.000 Hz de una manera alternante, para llevar a cabo una mezcla caótica en el fluido.

El uso de tubos de recogida de sangre es compatible con los sistemas automatizados de laboratorio habituales, y éstos son adaptables al análisis a gran escala y al muestreo aleatorio. Los tubos de recogida de sangre también minimizan los costes de manipulación y reducen la exposición de laboratorio a sangre completa y plasma y, por lo tanto, reducen el riesgo de que el personal de laboratorio contraiga un agente patógeno, tal como HIV o virus de la hepatitis B (HBV) o hepatitis C (HCV).
15

La combinación de la etapa de incubación con el tubo de recogida es especialmente eficaz y aumenta la sensibilidad del ensayo, al igual que la característica opcional de incubar las células en presencia de un carbohidrato simple, tal como dextrosa o glucosa.

20 Las células del sistema inmunitario mediado por células pierden la capacidad de generar una respuesta inmunitaria en la sangre completa después de un periodo prolongado tras la extracción de sangre del sujeto, y las respuestas sin intervención a menudo se reducen gravemente o desaparecen tras 24 desde la extracción de sangre. La reducción del trabajo y de la necesidad de material de plástico especializado permite llevar a cabo la estimulación inmunitaria mediada por células con antígenos en el punto de asistencia, tal como los consultorios médicos, clínicas,
25 instalaciones ambulatorias y clínicas veterinarias o granjas. Una vez que se completa la estimulación con el antígeno, ya no existe la necesidad de células recientes y activas. IFN-γ y otras citocinas o moléculas efectoras inmunitarias son estables en plasma y, así, la muestra se puede almacenar, o enviarla sin condiciones especiales o requisitos de rapidez.

La etapa de incubación puede ser de 1 a 50 horas, tal como 1 a 40 horas o 8 a 24 horas, o un periodo de tiempo intermedio que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28,
30 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 horas. Es especialmente adecuado un periodo de 24 horas.

La capacidad de medir la inmunidad mediada por células es importante para analizar la capacidad de un sujeto de responder a una infección por un agente patógeno, tal como un microorganismo o virus o parásito, generar una
35 respuesta autoinmunitaria, tal como en la diabetes autoinmunitaria, o proteger contra cánceres u otras afecciones oncológicas, o detectar una afección inflamatoria o detectar la exposición o sensibilidad de un sujeto a un agente tóxico, tal como berilio. El ensayo descrito en la presente memoria también posibilita la detección de enfermedades que conducen a la inmunodepresión o inmunodepresión inducida por medicamentos. Por lo tanto, la referencia a "medir una respuesta inmunitaria mediada por células en un sujeto" incluye y abarca el diagnóstico inmunitario de
40 enfermedades infecciosas y autoinmunitarias, un marcador de inmunocompetencia, así como un marcador de enfermedades inflamatorias, cáncer y agentes tóxicos. De manera importante, se determina la respuesta inmunitaria innata y/o adaptativa combinadas. Además, la capacidad de usar pequeños volúmenes de sangre posibilita que los ensayos se lleven a cabo fácilmente, por ejemplo, en poblaciones pediátricas, ancianas y enfermas. El ensayo de la presente memoria posibilita la detección temprana o la detección más sensible de la respuesta inmunitaria.

45 En una realización, las enfermedades que conducen a la inmunodepresión incluyen la infección crónica y el cáncer. Los medicamentos que pueden conducir a la inmunodepresión incluyen los usados para tratar la artritis reumatoide, el cáncer y la enfermedad inflamatoria intestinal.

Los agentes patógenos o infecciosos incluyen bacterias, parásitos y virus. Los ejemplos de bacterias incluyen los microorganismos gram-positivos y gram-negativos, tales como el género *Mycobacterium*, género *Staphylococcus*,
50 género *Streptococcus*, *Escherichia coli*, género *Salmonella*, género *Clostridium*, género *Shigella*, género *Proteus*, género *Bacillus*, género *Haemophilus*, género *Borrelia*, entre otros. *Mycobacterium tuberculosis* es un objetivo especialmente útil, así como las afecciones que surgen de la infección por *M. tuberculosis*, tales como la tuberculosis (TB). Los ejemplos de virus incluyen el virus de la hepatitis (virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis C), virus Herpes y virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), así como las enfermedades que resultan de ellas. Los
55 parásitos incluyen el género *Plasmodium*, dermatofitos, parásitos hepáticos y similares. Otros agentes patógenos incluyen células eucarióticas tales como levaduras y hongos.

Las enfermedades autoinmunitarias contempladas en la presente memoria para la detección incluyen, entre otras, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria,

esclerosis múltiple, enfermedad autoinmunitaria de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, celiacía-dermatitis, síndrome de fatiga crónica (CFIDS), desmielinización inflamatoria crónica, polineuropatía inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad por crioaglutininas, enfermedad de Crohn, dermatitis herpetiforme, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, diabetes dependiente de insulina (Tipo I), liquen plano, lupus, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, miastenia gravis, miocarditis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis y vitiligo.

En general, es importante analizar la respuesta mediada por células potencial o real en los sujetos expuestos a estas entidades infecciosas. También se puede usar el método de la presente invención para detectar la presencia o ausencia de estas afecciones, así como el nivel o la etapa del proceso de la enfermedad.

Otras enfermedades que pueden conducir a la inmunodepresión incluyen las enfermedades inflamatorias.

Los ejemplos de enfermedades inflamatorias contempladas por la presente descripción incluyen, pero sin limitación, las enfermedades y trastornos que dan como resultado una respuesta de enrojecimiento, hinchazón, dolor, y una sensación de calor en ciertas áreas que se supone que protege a los tejidos afectados por la lesión o enfermedad. Las enfermedades inflamatorias que se pueden tratar mediante el uso de los métodos de la presente descripción incluyen, sin limitación, acné, angina de pecho, artritis, neumonía por aspiración, empiema, gastroenteritis, inflamación, gastroenteritis vírica, NEC, enterocolitis necrosante, enfermedad inflamatoria pélvica, faringitis, PID, pleuritis, garganta inflamada, enrojecimiento, rubor, amigdalitis, gastroenteritis vírica e infecciones del tracto urinario, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica. Con respecto a las aplicaciones no humanas, la presente descripción se amplía para detectar HPIE en caballos y diversas afecciones en animales, tales como la enfermedad de tumores faciales en el demonio de Tasmania.

La terapia del cáncer también es en cierto grado dependiente de la inmunidad mediada por células, y el cáncer propiamente dicho o los fármacos usados para tratar el cáncer pueden conducir a una inmunodepresión. Los cánceres contemplados en la presente memoria incluyen: un grupo de enfermedades y trastornos que se caracterizan por un crecimiento celular descontrolado (p.ej. la formación de un tumor) sin la diferenciación de esas células hasta células especializadas y diferentes. Tales enfermedades y trastornos incluyen el protooncogén ABL1, cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenoquístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnogénica, alopecia, sarcoma alveolar de partes blandas, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres óseos, cáncer intestinal, glioma del tronco encefálico, tumores cerebrales y del SNC, cáncer de mama, tumores del SNC, tumores carcinoides, cáncer de cuello uterino, tumores cerebrales infantiles, cáncer infantil, leucemia infantil, sarcoma infantil de tejidos blandos, condrosarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cánceres colorrectales, linfoma de células T cutáneas, dermatofibrosarcoma protuberans, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer endometrial, endometrioma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de vías biliares extrahepáticas, cáncer de ojo, melanoma ocular, retinoblastoma, cáncer de trompas de Falopio, anemia de Fanconi, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor carcinoide gastrointestinal, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, neoplasias malignas hematológicas, leucemia de células peludas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, papilomavirus humano, mola hidatiforme, hipercalcemia, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, cáncer de células de islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer laríngeo, leiomiomasarcoma, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labio, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide maligno de riñón, meduloblastoma, melanoma, cáncer de células de Merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, mieloma, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de Nijmegen, cáncer de piel distinto de melanoma, cáncer de pulmón de células no microcíticas (NSCLC), cánceres oculares, cáncer esofágico, cáncer de la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer ovárico con ostomía, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer de glándula parótida, cáncer de pene, tumores neuroectodérmicos periféricos, cáncer de hipófisis, policitemia vera, cáncer de próstata, cánceres infrecuentes y trastornos asociados, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, síndrome de Rothmund-Thomson, cáncer de glándula salival, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células microcíticas (SCLC), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, tumores de la médula espinal, carcinoma de células escamosas (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición (vejiga), cáncer de células de transición (pelvis renal/uréter),

cáncer trofoblástico, cáncer uretral, cáncer del aparato urinario, uroplaquinas, sarcoma uterino, cáncer de útero, cáncer vaginal, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilms.

5 En los aspectos anteriores, el antígeno puede derivar del agente patógeno, estar asociado a la enfermedad o cáncer, o ser el agente tóxico. De manera alternativa, la infección, enfermedad, cáncer o agente tóxico puede inhibir la inmunidad mediada por células, en cuyo caso se podría emplear cualquier antígeno al que el sujeto se haya expuesto anteriormente.

10 La detección de las moléculas efectoras inmunitarias se puede medir a nivel de proteína o de ácido nucleico. Por lo tanto, la referencia a la "presencia o nivel" de la molécula efectora inmunitaria incluye datos directos e indirectos. Por ejemplo, los niveles elevados de mRNA de una citocina son datos indirectos que muestran niveles incrementados de la citocina.

15 Los ligandos hacia los efectores inmunitarios son especialmente útiles para detectar y/o cuantificar estas moléculas. Los anticuerpos hacia los efectores inmunitarios son especialmente útiles. Los métodos para los ensayos contemplados en la presente memoria se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, radioinmunoensayos, ensayos tipo sándwich, ELISA y ELISpot. La referencia a los "anticuerpos" incluye las partes de anticuerpos, anticuerpos adaptados a mamíferos (p.ej. humanizados), anticuerpos desinmunizados, anticuerpos recombinantes o sintéticos y anticuerpos híbridos y de cadena simple. Para los ensayos en piel, en seres humanos, los anticuerpos humanizados o desinmunizados se contemplan especialmente en la presente memoria para detectar moléculas efectoras.

20 Los anticuerpos policlonales y monoclonales son obtenibles mediante inmunización con las moléculas efectoras inmunitarias o fragmentos antigénicos de las mismas, y cada tipo es utilizable para los inmunoensayos. Los métodos para obtener ambos tipos de sueros son muy conocidos en la técnica. Se prefieren menos los sueros policlonales, pero se preparan de manera relativamente sencilla mediante la inyección en un animal de laboratorio adecuado de una cantidad eficaz del efector inmunitario, o parte antigénica del mismo, la recogida del suero del animal y el aislamiento de sueros específicos mediante cualquiera de las técnicas inmunoabsorbentes conocidas. Aunque los anticuerpos producidos mediante este método son utilizables en prácticamente cualquier tipo de inmunoensayo, en general son menos favorables debido a la heterogeneidad potencial del producto.

25 El uso de anticuerpos monoclonales en un inmunoensayo es especialmente útil debido a la capacidad de producirlos en grandes cantidades y a la homogeneidad del producto. La preparación de líneas celulares de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales obtenidos fusionando una línea celular inmortal y linfocitos sensibilizados hacia la preparación inmunógena se puede realizar mediante métodos que son muy conocidos para los expertos en la técnica.

30 La detección de una molécula efectora inmunitaria en una muestra que comprende linfocitos de un sujeto puede comprender poner en contacto la muestra o una alícuota de la muestra con un anticuerpo específico hacia la molécula efectora inmunitaria o un fragmento antigénico de la misma durante un tiempo y en condiciones suficientes para que se forme un complejo anticuerpo-molécula efectora, y después detectar el complejo, en el que la molécula efectora inmunitaria se genera tras la incubación de los linfocitos con un antígeno y una cantidad limitante de un agonista de TLR.

35 Una "muestra" incluye sangre completa o una fracción de la misma que comprende linfocitos. Este método incluye micro-matrices, macro-matrices y nano-matrices sobre soportes sólidos planos o esféricos. Una micro- o macro-matriz es útil. Una "muestra" también incluye una muestra de pequeño volumen de alrededor de 0,5 µl a 1000 µl, lo que incluye 5 µl, 10 µl, 20 µl, 50 µl y 100 µl, así como volúmenes mayores tales como de 1 ml a alrededor de 200 ml, tal como 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml o 20 ml.

Hay disponible una amplia variedad de técnicas de inmunoensayos, como se puede observar mediante referencia a las patentes de EE.UU. N°s 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653.

45 Lo siguiente es una descripción de un tipo de ensayo. Se inmoviliza un anticuerpo sin marcar sobre un sustrato sólido y la muestra en la que se van a ensayar las moléculas efectoras inmunitarias (p.ej. una citocina) se pone en contacto con la molécula unida. Tras un periodo adecuado de incubación, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo anticuerpo-molécula efectora inmunitaria, se añade un segundo anticuerpo específico hacia la molécula efectora, marcado con una molécula indicadora capaz de producir una señal detectable, y se incuba, y se proporciona un tiempo suficiente para la formación de otro complejo anticuerpo-molécula efectora-anticuerpo marcado. Cualquier material sin reaccionar se elimina mediante lavado, y se determina la presencia de la molécula efectora mediante la observación de una señal producida por la molécula indicadora. Los resultados pueden ser cualitativos, mediante simple observación de la señal visible, o se pueden cuantificar comparándolos con una muestra de control que contiene cantidades conocidas del antígeno. Este método generalizado es muy conocido para los expertos en la técnica, al igual que lo sería cualquiera de diversas variaciones.

55 En estos ensayos, un primer anticuerpo que tiene especificidad hacia las presentes moléculas efectoras inmunitarias se une de manera covalente o pasiva a una superficie sólida. La superficie sólida es en general vidrio o un polímero, y los polímeros usados más habitualmente son celulosa, poli(acrilamida), nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o

polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, microesferas, esferas, discos de microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para llevar a cabo un inmunoensayo. Los procesos de unión son muy conocidos en la técnica, y en general consisten en entrecruzar, unir covalentemente o adsorber físicamente el complejo polímero-anticuerpo lavado en la preparación para la muestra de ensayo. Después se añade una alícuota de la muestra a ensayar al complejo en fase sólida y se incuba durante un periodo de tiempo suficiente (p.ej. 2-120 minutos o, cuando sea más adecuado, durante la noche) y en condiciones adecuadas (p.ej. de alrededor de 20°C a alrededor de 40°C) para permitir la unión de cualquier subunidad presente en el anticuerpo. Tras el periodo de incubación, se lava la subunidad del anticuerpo en fase sólida y se seca, y se incuba con un segundo anticuerpo específico hacia una porción de la molécula efectora. El segundo anticuerpo está unido a una molécula indicadora que se usa para indicar la unión del segundo anticuerpo a la molécula efectora.

Existen muchas variaciones para este ensayo. Una variación especialmente útil es un ensayo simultáneo en el que todos o muchos de los componentes se mezclan sustancialmente de manera simultánea. Además, se puede determinar la unión de un anticuerpo a una citocina mediante la unión de un anticuerpo marcado dirigido hacia el primer anticuerpo mencionado.

Una "molécula indicadora", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, significa una molécula que, por su naturaleza química, proporciona una señal identificable analíticamente que permite la detección del antígeno-anticuerpo unido. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa. Las moléculas indicadoras usadas más habitualmente en este tipo de ensayo son enzimas, fluoróforos o moléculas que contienen radionúclidos (es decir, radioisótopos) y moléculas quimioluminiscentes. Los ejemplos de fluoróforos adecuados se proporcionan en la Tabla 1. En el caso de un inmunoensayo enzimático, se conjuga una enzima al segundo anticuerpo, en general por medio de glutaraldehído o peryodato. Como se reconocerá fácilmente, sin embargo, existe una amplia diversidad de técnicas de conjugación diferentes, que están fácilmente disponibles para el técnico experto. Las enzimas usadas habitualmente incluyen la peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos a usar con las enzimas específicas se eligen en general para la producción, tras la hidrólisis mediante la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen la fosfatasa alcalina y peroxidasa. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, que proporcionan un producto fluorescente en vez de los sustratos cromogénicos indicados anteriormente. En todos los casos, el anticuerpo marcado con enzima se añade al primer complejo anticuerpo-antígeno, se deja que se una, y después el reactivo en exceso se elimina mediante lavado. Después se añade una disolución que contiene el sustrato adecuado al complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El sustrato reaccionará con la enzima unida al segundo anticuerpo, lo que proporcionará una señal visual cualitativa, que además se puede cuantificar, normalmente de manera espectrofotométrica, para proporcionar una indicación de la cantidad de antígeno que había presente en la muestra. De nuevo, la presente descripción se amplía a un ensayo sustancialmente simultáneo.

De manera alternativa, se pueden acoplar químicamente compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, a los anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa mediante iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo absorbe la energía luminosa, lo que induce un estado de excitabilidad en la molécula, seguido de la emisión de la luz de un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Se deja que el anticuerpo marcado con fluorescencia se una al primer complejo anticuerpo-antígeno. Después de eliminar mediante lavado el reactivo sin unir, el complejo terciario restante se expone a la luz de la longitud de onda adecuada, y la fluorescencia observada indica la presencia del antígeno de interés. Los métodos de inmunofluorescencia y de inmunoensayo enzimático están muy bien establecidos en la técnica, y se prefieren especialmente para el presente método. Sin embargo, también se pueden emplear otras moléculas indicadoras, tales como moléculas con radioisótopos, moléculas quimioluminiscentes o bioluminiscentes.

Existe una diversidad de otros sistemas de detección que se pueden emplear, que incluyen oro coloidal, y la presente descripción abarca tales sistemas de detección.

La presente descripción también contempla los ensayos genéticos, tales como los que implican el análisis mediante PCR para detectar productos de expresión de ARN de una secuencia genética que codifica un efector inmunitario.

En una realización, la PCR se lleva a cabo mediante el uso de pares de cebadores, uno o ambos de los cuales están marcados en general con la misma molécula indicadora o con una molécula indicadora diferente capaz de proporcionar una señal distinguible. El uso de fluoróforos es especialmente útil en la práctica de la presente descripción. Los ejemplos de fluoróforos adecuados se pueden seleccionar de la lista proporcionada en la Tabla 1. Otros marcadores incluyen los colorantes luminiscentes y fosforescentes, así como los infrarrojos. Estos colorantes o fluoróforos también se pueden usar como moléculas indicadoras para los anticuerpos.

ES 2 628 627 T3

Tabla 1

Lista de fluoróforos adecuados

Sonda	Ex ¹ (nm)	Em ² (nm)
Reactivo y sondas conjugadas		
Hidroxycumarina	325	386
Aminocumarina	350	455
Metoxicumarina	360	410
Azul Cascada	375; 400	423
Amarillo Lucifer	425	528
NBD	466	539
R-Ficoeritrina (PE)	480; 565	578
Conjugados PE-Cy5	480; 565; 650	670
Conjugados PE-Cy7	480; 565; 743	767
Conjugados APC-Cy7	650; 755	767
Rojo 613	480; 565	613
Fluoresceína	495	519
FluorX	494	520
BODIPY-FL	503	512
TRITC	547	574
X-Rodamina	570	576
Lisamina Rodamina B	570	590
PerCP	490	675
Rojo Texas	589	615
Alofocianina (APC)	650	660
TruRed	490, 675	695
Alexa Fluor 350	346	445
Alexa Fluor 430	430	545
Alexa Fluor 488	494	517
Alexa Fluor 532	530	555
Alexa Fluor 546	556	573
Alexa Fluor 555	556	573
Alexa Fluor 568	578	603
Alexa Fluor 594	590	617
Alexa Fluor 633	621	639
Alexa Fluor 647	650	688
Alexa Fluor 660	663	690
Alexa Fluor 680	679	702
Alexa Fluor 700	696	719
Alexa Fluor 750	752	779
Cy2	489	506
Cy3	(512); 550	570; (615)
Cy3,5	581	596; (640)

ES 2 628 627 T3

Sonda	Ex ¹ (nm)	Em ² (nm)
Reactivo y sondas conjugadas		
Cy5	(625); 650	670
Cy5,5	675	694
Cy7	743	767
Sondas de ácido nucleico		
Hoechst 33342	343	483
DAPI	345	455
Hoechst 33258	345	478
Azul SYTOX	431	480
Cromomicina A3	445	575
Mitramicina	445	575
YOYO-1	491	509
Verde SYTOX	504	523
Naranja SYTOX	547	570
Bromuro de Etidio	493	620
7-AAD	546	647
Naranja de Acridina	503	530/640
TOTO-1, TO-PRO-1	509	533
Naranja de Tiazol	510	530
Yoduro de Propidio (PI)	536	617
TOTO-3, TO-PRO-3	642	661
LDS 751	543; 590	712; 607
Proteínas Fluorescentes		
Y66F	360	508
Y66H	360	442
EBFP	380	440
Tipo natural	396, 475	50, 503
GFPuv	385	508
ECFP	434	477
Y66W	436	485
S65A	471	504
S65C	479	507
S65L	484	510
S65T	488	511
EGFP	489	508
EYFP	514	527
DsRed	558	583
Otras sondas		
Monoclorobimano	380	461
Calceína	496	517
¹ Ex: Longitud de onda de excitación máxima (nm) ² Em: Longitud de onda de emisión máxima (nm)		

La presente memoria abarca cualquier método adecuado para analizar la emisión de fluorescencia. A este respecto, las técnicas enseñadas en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, la espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo de 2 fotones y 3 fotones como, por ejemplo, la descrita por Lakowicz *et al.* (1997) *Biophys. J.* 72:567, la formación de imágenes mediante el tiempo de vida de fluorescencia como, por ejemplo, la descrita por Eriksson *et al.* (1993) *Biophys. J.* 2:64 y la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia como, por ejemplo, la descrita por Youvan *et al.* (1997) *Biotechnology et alia* 3:1-18.

Un marcador luminiscente o fosforescente adecuado puede dar como resultado luminiscencia y fosforescencia, respectivamente, tal como se conoce en la técnica. A este respecto, se puede usar cualquier medio óptico para identificar tal marcador.

Un colorante infrarrojo adecuado puede dar como resultado radiación infrarroja. Los colorantes infrarrojos ejemplares que se pueden emplear en la presente descripción incluyen, pero sin limitación, los descritos en Lewis *et al.* (1999) *Dyes Pigm.* 42(2):197, Tawa *et al. Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 488 [Electrical, Optical and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials IV], 885-890, Daneshvar *et al.* (1999) *J. Immunol. Methods* 226(1-2):119-128, Rapaport *et al.* (1999) *Appl. Phys. Lett.* 74(3):329-331 y Durig *et al.* (1993) *J. Raman Spectrosc.* 24(5):281-285. Se puede emplear cualquier método espectroscópico infrarrojo adecuado para detectar el colorante infrarrojo. Por ejemplo, a este respecto se puede usar espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier como describió, por ejemplo, Rahman *et al.* (1998) *J. Org. Chem.* 63:6196.

De manera adecuada, la difracción, reflexión, polarización o refracción de la radiación electromagnética incidente, que incluye la luz y los rayos X, puede dar como resultado la dispersión electromagnética. Tal dispersión se puede usar para cuantificar el nivel de mARN o el nivel de proteína.

La citometría de flujo es especialmente útil para analizar la emisión del fluoróforo.

Como se conoce en la técnica, la citometría de flujo es una técnica de alto rendimiento que implica analizar rápidamente las características físicas y químicas de las partículas (p.ej. mARN, ADN o proteínas marcadas) a medida que pasan a través de la trayectoria de uno o más haces de láser mientras están suspendidas en una corriente de fluido. A medida que cada partícula intercepta el haz de láser, se detecta la luz dispersada y la luz fluorescente emitida por cada célula o partícula y se registra mediante el uso de cualquier algoritmo de seguimiento adecuado tal como, por ejemplo, se describe más adelante en el presente documento.

Un citómetro de flujo moderno es capaz de llevar a cabo estas tareas a una velocidad de hasta 100.000 células/partículas s^{-1} . Por medio del uso de una matriz óptica de filtros y espejos dicróicos, se pueden separar las diferentes longitudes de onda de la luz fluorescente y detectarlas de manera simultánea. Además, se pueden usar varios láseres con diferentes longitudes de onda de excitación. Por lo tanto, se puede usar una diversidad de fluoróforos para seleccionar como objetivo y examinar, por ejemplo, diferentes efectores inmunitarios en una muestra o efectores inmunitarios de múltiples sujetos.

Los citómetros de flujo adecuados que se pueden usar en los métodos de la presente descripción incluyen los que miden de cinco a nueve parámetros ópticos (véase la Tabla 2) mediante el uso de un único láser de excitación, habitualmente un láser de ión argón refrigerado por aire que funciona a 15 mW en su línea espectral de 488 nm. Los citómetros de flujo más avanzados son capaces de usar múltiples láseres de excitación, tal como un láser de HeNe (633 nm) o un láser de HeCd (325 nm) además del láser de ión argón (488 o 514 nm).

Tabla 2

Parámetros ópticos ejemplares que se pueden medir con un citómetro de flujo.

Parámetro	Acrónimo	Ángulo de detección del haz láser incidente	Longitud de onda (nm)
Luz dispersada frontalmente	FS	2-5°	488*
Luz dispersada lateralmente	SS	90°	488*
Fluorescencia "verde"	FL1	90°	510-54 [†]
Fluorescencia "amarilla"	FL2	90°	560-580 [†]
Fluorescencia "roja"	FL3	90°	>650 [#]
* mediante el uso de un láser de excitación de 488 nm			
[†] anchura del filtro de paso de banda			
[#] filtro de paso largo			

Por ejemplo, Biggs *et al.* (1999) *Cytometry* 36:36-45 ha construido un citómetro de flujo de 11 parámetros mediante el uso de tres láseres de excitación, y ha demostrado el uso de nueve fluoróforos distinguibles además de las

medidas de dispersión frontal y lateral con el fin de inmunofenotipar (es decir, clasificar) partículas. La selección de los parámetros que se puede usar de manera adecuada depende en gran medida de los coeficientes de extinción, los rendimientos cuánticos y la cantidad de solapamiento espectral entre todos los fluoróforos (Malemed *et al.* (1990) "*Flow cytometry and sorting*", 2ª Ed., Nueva York, Wiley-Liss). Se entenderá que la presente descripción no se limita a ningún citómetro de flujo particular o ningún grupo particular de parámetros. A este respecto, la descripción también contempla el uso, en lugar de un citómetro de flujo convencional, de un citómetro de flujo microfabricado como describió, por ejemplo, Fu *et al.* (1999) *Nature Biotechnology* 17:1109-1111.

El ensayo posibilitado en la presente memoria se puede automatizar o semi-automatizar para el cribado de alto rendimiento o para el cribado en busca de varios efectores inmunitarios de un sujeto. La automatización se controla de manera conveniente mediante un programa informático.

La presente descripción contempla además, por lo tanto, sistemas basados y no basados en Internet en los que los datos sobre la respuesta inmunitaria mediada por células de un sujeto se proporcionan mediante un servidor cliente o una plataforma de otra arquitectura a un procesador central que los analiza y compara respecto de un control, y opcionalmente considera otra información, tal como la edad del paciente, el sexo, el peso y otras afecciones médicas, y después proporciona un informe, tal como, por ejemplo, un factor de riesgo para la gravedad de una enfermedad o progresión o estado o un índice de probabilidad de desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, también se proporciona un método de negocio, por el cual se recoge sangre en tubos transportables en los que después se analiza la respuesta inmunitaria mediada por células en una localización definida, y los resultados se envían después en forma de un informe electrónico por medio de un servidor cliente o una plataforma de otra arquitectura a un profesional sanitario.

Por lo tanto, el equipo y los programas informáticos basados en el conocimiento también forman parte de la presente descripción. Esto facilita a la asistencia sanitaria determinar si una enfermedad, que incluye infección, cáncer o inflamación, o un medicamento o agente tóxico están induciendo o están asociados a la inmunodepresión.

Los ensayos posibilitados por la presente descripción se pueden usar en una arquitectura o plataformas basadas en el conocimiento existentes o recién desarrolladas asociadas a los servicios de patología. Por ejemplo, los resultados de los ensayos se transmiten a través de una red de comunicaciones (p.ej. Internet) o una conexión telefónica a un sistema de procesamiento en el que se almacena un algoritmo y se usa para generar un valor de probabilidad a posteriori predicho que se traduce al índice de respuesta inmunitaria mediada por células o inmunodepresión, que después se envía a un usuario final en forma de un informe de diagnóstico o predictivo. Este informe también puede formar la base del tratamiento clínico y de la medicina personalizada.

El ensayo, por lo tanto, puede estar en forma de un kit o sistema informático que comprende los reactivos necesarios para detectar la concentración de la molécula efectora inmunitaria tras la exposición de los linfocitos a un antígeno y una cantidad limitante de un agonista de TLR, y el equipo y/o programas informáticos para facilitar la determinación y transmisión de los informes a un médico.

Por ejemplo, la presente descripción enseña un método para permitir que un usuario determine el estado de la respuesta inmunitaria mediada por células de un sujeto, y el método incluye:

(a) recibir datos en forma de niveles o concentraciones de una molécula efectora inmunitaria que, respecto de un control, proporcionan una correlación con respecto al estado de la respuesta inmunitaria mediada por células en un sujeto, a través de una red de comunicaciones, y la molécula efectora inmunitaria se mide tras la exposición de los linfocitos a un antígeno y una cantidad limitante de un agonista de TLR;

(b) procesar los datos del sujeto por medio de un análisis univariante o multivariante para proporcionar un valor de respuesta inmunitaria;

(c) determinar el estado del sujeto de acuerdo con los resultados del valor de la respuesta inmunitaria en comparación con los valores predeterminados; y

(d) transferir una indicación del estado del sujeto al usuario a través de la red de comunicaciones.

La referencia al análisis "univariante" o "multivariante" incluye un algoritmo que realiza la función de análisis univariante o multivariante.

De manera conveniente, el método incluye además en general:

(a) hacer que el usuario determine los datos mediante el uso de una estación terminal remota; y

(b) transferir los datos desde la estación terminal hasta la estación base a través de la red de comunicaciones.

La estación base puede incluir un primer y segundo sistema de procesamiento, en cuyo caso el método puede incluir:

(a) transferir los datos al primer sistema de procesamiento;

(b) transferir los datos al segundo sistema de procesamiento; y

(c) hacer que el primer sistema de procesamiento lleve a cabo la función de análisis univariante o multivariante para generar el valor de la respuesta inmunitaria mediada por células.

El método puede incluir además:

5 (a) transferir los resultados de la función de análisis univariante o multivariante al primer sistema de procesamiento; y

(b) hacer que el primer sistema de procesamiento determine el estado del sujeto.

En este caso, el método incluye además al menos uno de:

10 (a) transferir los datos entre la red de comunicaciones y el primer sistema de procesamiento a través de un primer cortafuegos; y

(b) transferir los datos entre el primer y el segundo sistema de procesamiento a través de un segundo cortafuegos.

El segundo sistema de procesamiento se puede acoplar a una base de datos adaptada para almacenar datos predeterminados y/o la función de análisis univariante o multivariante, y el método incluye:

15 (a) consultar la base de datos para obtener al menos los datos predeterminados seleccionados o acceso a la función de análisis univariante o multivariante desde la base de datos; y

(b) comparar los datos predeterminados seleccionados respecto de los datos del sujeto o generar un índice de probabilidad predicha de un nivel de respuesta inmunitaria celular o inmunodepresión.

El segundo sistema de procesamiento se puede acoplar a una base de datos, y el método incluye almacenar los datos en la base de datos.

20 El método puede incluir además hacer que la estación base:

(a) determine la información de pago, y la información de pago representa la provisión del pago por parte del usuario; y

(b) lleve a cabo la comparación en respuesta a la determinación de la información de pago.

25 La presente descripción también proporciona una estación base para determinar el estado de un sujeto con respecto a la respuesta inmunitaria mediada por células o inmunodepresión, y la estación base incluye:

(a) un método de almacenamiento;

(b) un sistema de procesamiento, y el sistema de procesamiento está adaptado para:

30 (c) recibir los datos del sujeto desde el usuario a través de una red de comunicaciones, y los datos incluyen los niveles de la molécula efectora inmunitaria, en el que el nivel de la molécula efectora respecto de un control proporciona una correlación con respecto al estado de la respuesta inmunitaria mediada por células, en el que la molécula efectora inmunitaria se determina tras la exposición de los linfocitos a un antígeno y una cantidad limitante de un agonista de TLR;

(d) llevar a cabo una función algorítmica que incluye comparar los datos con respecto a los datos predeterminados;

35 (e) determinar el estado del sujeto de acuerdo con los resultados de la función algorítmica que incluye la comparación; y

(c) transmitir una indicación del estado del sujeto al usuario a través de la red de comunicaciones.

El sistema de procesamiento se puede adaptar para recibir datos de una estación terminal remota adaptada para determinar los datos.

El sistema de procesamiento puede incluir:

40 (a) un primer sistema de procesamiento adaptado para:

(i) recibir los datos; y

(ii) determinar el estado del sujeto de acuerdo con los resultados de la función de análisis univariante o multivariante que incluye comparar los datos; y

(b) un segundo sistema de procesamiento adaptado para:

- (i) recibir los datos del sistema de procesamiento;
- (ii) llevar a cabo la función de análisis univariante o multivariante que incluye la comparación; y
- (iii) transferir los resultados al primer sistema de procesamiento.

5 El sistema de procesamiento se puede acoplar a una base de datos, y el sistema de procesamiento se adapta para almacenar los datos en la base de datos.

Por lo tanto, los niveles de la molécula efectora inmunitaria se pueden cribar solos o en combinación con otros biomarcadores o indicadores de enfermedad. Un nivel "alterado" significa un incremento o elevación o una disminución o reducción de las concentraciones de la molécula efectora inmunitaria.

10 La determinación de las concentraciones o niveles de la molécula efectora inmunitaria posibilita el establecimiento de una regla de diagnóstico basada en las concentraciones respecto de los controles. De manera alternativa, la regla de diagnóstico se basa en la aplicación de un algoritmo estadístico y de aprendizaje automático. Tal algoritmo usa las relaciones entre la molécula efectora y el estado de la enfermedad observadas en los datos de entrenamiento (con un estado conocido de la enfermedad o de la respuesta inmunitaria mediada por células) para deducir las relaciones que se usan después para predecir el estado de sujetos con un estado desconocido. Se puede emplear un algoritmo que proporcione el índice de probabilidad de que un sujeto tenga un cierto nivel de respuesta inmunitaria mediada por células y/o una enfermedad. El algoritmo lleva a cabo una función de análisis univariante o multivariante.

20 Por lo tanto, la presente descripción proporciona una regla de diagnóstico basada en la aplicación de algoritmos estadísticos y de aprendizaje automático. Tal algoritmo usa las relaciones entre la molécula efectora inmunitaria y el nivel de la respuesta inmunitaria mediada por células o inmunodepresión observadas en los datos de entrenamiento (con un estado inmunitario conocido) para deducir las relaciones que se usan después para predecir el estado de los pacientes con un estado inmunitario desconocido. Los profesionales expertos en la técnica de análisis de datos reconocen que se pueden usar muchas formas diferentes para deducir las relaciones en los datos de entrenamiento sin cambiar considerablemente la presente descripción.

25 La presente descripción contempla además el uso de una base de conocimiento de datos de entrenamiento que comprende los niveles de la molécula efectora inmunitaria de un sujeto con un nivel conocido de respuesta inmunitaria mediada por células para generar un algoritmo que, tras la entrada de una segunda base de datos de conocimiento que comprende los niveles de la misma molécula efectora inmunitaria de un sujeto con un nivel desconocido de respuesta inmunitaria, proporciona un índice de probabilidad que predice la naturaleza de la respuesta inmunitaria mediada por células.

30 La expresión "datos de entrenamiento" incluye el conocimiento de los niveles de una molécula efectora inmunitaria respecto de un control, en el que la molécula efectora inmunitaria se determina tras la exposición de los linfocitos a un antígeno y una cantidad limitante de uno o más agentes adaptativos que potencian el sistema inmunitario innato y/o adaptativo. Un "control" incluye una comparación respecto de los niveles de una molécula efectora inmunitaria en un sujeto con una respuesta inmunitaria "normal", o puede ser un nivel determinado estadísticamente basado en ensayos.

Por lo tanto, la expresión "datos de entrenamiento" incluye los niveles de una molécula efectora inmunitaria.

40 Los niveles o las concentraciones de la molécula efectora inmunitaria proporcionan los datos de ensayo de entrada denominados en la presente memoria "segunda base de datos de conocimiento". La segunda base de datos de conocimiento se considera respecto de un control, o se alimenta en un algoritmo generado por una "primera base de datos de conocimiento" que comprende información de los niveles de un efector inmunitario en un sujeto con un estado inmunológico conocido. La segunda base de datos de conocimiento es de un sujeto de estado desconocido con respecto a la respuesta inmunitaria mediada de células. La salida del algoritmo o la comparación respecto de un control es un factor de probabilidad o riesgo, denominado en la presente memoria "un índice de probabilidad", de que un sujeto tenga un cierto nivel de respuesta inmunitaria o inmunosupresor.

50 Los datos generados a partir de los niveles de la molécula efectora inmunitaria son los datos de entrada. La entrada de datos que comprenden los niveles de efectores inmunitarios se compara con un control o se introduce en el algoritmo que proporciona un valor de riesgo de la probabilidad de que el sujeto tenga, por ejemplo, una afección inmunosupresora. También se puede monitorizar un régimen de tratamiento para determinar la presencia de cualquier inmunodepresión. Un nivel de inmunodepresión puede incrementar el riesgo de un sujeto de contraer una infección secundaria o de tener una recidiva (p.ej. durante la terapia del cáncer o el tratamiento de una infección patógena).

55 Como se describió anteriormente, los métodos para diagnosticar una respuesta inmunitaria o afección inmunosupresora determinando el grado en el que un sujeto puede generar una respuesta inmunitaria innata y/o adaptativa por medio de un nivel de una molécula efectora inmunitaria proporciona una segunda base de datos de conocimiento en un algoritmo generado con la primera base de datos de conocimiento o niveles de la misma

molécula efectora en sujetos con un estado inmunitario conocido. También se proporcionan métodos para detectar una respuesta inmunitaria que comprende determinar la presencia y/o velocidad de una molécula efectora inmunitaria tras la estimulación del sistema inmunitario innato y/o adaptativo en una muestra de un sujeto. "Velocidad" significa el cambio de la concentración de la molécula efectora en una muestra de un sujeto a lo largo del tiempo.

5 Como se indicó anteriormente, el término "muestra", tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier muestra que contiene uno o más linfocitos que incluye, pero sin limitación, sangre completa, una fracción de sangre completa, extractos de tejido y células recién recogidas.

10 El método de la presente descripción se puede usar en el diagnóstico y el inicio de una enfermedad. La presente descripción también se puede usar para monitorizar la progresión de una afección y para monitorizar si un tratamiento particular es eficaz o no. En particular, el método se puede usar para monitorizar la inmunodepresión tras cirugía, terapia del cáncer u otra medicación o exposición a agentes tóxicos.

La descripción contempla un método para monitorizar la inmunodepresión en un sujeto, que comprende:

(a) proporcionar una muestra de un sujeto;

15 (b) determinar el nivel de una molécula efectora inmunitaria tras la estimulación mediante un antígeno y una cantidad limitante de un agonista de TLR;

en el que el nivel del efector inmunitario respecto de un control proporciona una correlación respecto del estado de la respuesta inmunitaria mediada por células, y someter los niveles a un algoritmo para proporcionar un índice de probabilidad de que el sujeto tenga un cierto nivel de respuesta inmunitaria; y

20 (c) repetir las etapas (a) y (b) en un momento posterior, y comparar el resultado de la etapa (b) con el resultado de la etapa (c), en el que una diferencia en el índice de probabilidad es indicativa de la progresión de la afección en el sujeto.

25 La referencia a un "algoritmo" o "funciones algorítmicas", como se resumió anteriormente, incluye la ejecución de una función de análisis univariante o multivariante. Se puede poner en práctica una diversidad de diferentes arquitecturas y plataformas, además de las descritas anteriormente. Se apreciará que se puede usar cualquier forma de arquitectura adecuada para poner en práctica la presente descripción. Sin embargo, una técnica beneficiosa es el uso de arquitecturas distribuidas. En particular, se pueden proporcionar varias estaciones terminales en localizaciones geográficas respectivas. Esto puede incrementar la eficacia del sistema reduciendo los costes y requisitos de ancho banda de datos, así como asegurando que si una estación base se congestiona o falla, otras estaciones terminales podrían reemplazarla. Esto también permite el reparto de la carga o similares, para asegurar que el acceso al sistema está disponible en todo momento.

30 En este caso, sería necesario asegurar que la estación base contenga la misma información e identificación, de forma que se puedan usar diferentes estaciones terminales.

35 También se apreciará que, en un ejemplo, las estaciones terminales pueden ser dispositivos portátiles, tales como PDAs, teléfonos móviles, o similares, que son capaces de transferir los datos del sujeto a la estación base a través de una red de comunicaciones tal como Internet, y recibir los informes.

40 En los aspectos anteriores, el término "datos" significa los niveles o las concentraciones del efector inmunitario tras la estimulación mediante un antígeno en presencia de una cantidad limitante de un agonista de TLR. La "red de comunicaciones" incluye Internet y una red de telefonía móvil y una línea de telefonía fija. Cuando se usa un servidor, en general es un servidor cliente, o más en particular un protocolo de acceso a objetos simples (SOAP).

45 Los métodos de unión inmunitaria para detectar o cuantificar la cantidad de un componente reactivo en una muestra incluyen métodos que requieren la detección o cuantificación de cualquier complejo inmunitario formado durante el proceso de unión. En este caso, se obtendría una muestra que se sospecha que contiene una citocina tras la estimulación de los linfocitos con un antígeno en presencia de una cantidad limitante de agonista de TLR, y se pondría en contacto la muestra con un anticuerpo y después se detectaría o cuantificaría la cantidad de complejos inmunitarios formados en las condiciones específicas.

50 La puesta en contacto de la muestra biológica elegida con el anticuerpo en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunitarios (complejos inmunitarios primarios) consiste en general en añadir la composición a la muestra e incubar la mezcla durante un periodo de tiempo lo suficientemente largo para que los anticuerpos formen complejos inmunitarios con, es decir, se unan a, cualquier molécula efectora presente. Tras este tiempo, la composición muestra-anticuerpo, tal como un corte de tejido, placa de ELISA, ELISpot, transferencia puntual o transferencia de Western, se lavará en general para eliminar cualquier especie de anticuerpo unido de manera inespecífica, lo que permitirá detectar solamente los anticuerpos unidos de manera específica en los complejos inmunitarios primarios.

- La presente descripción enseña un método para detectar la presencia, ausencia, nivel o etapa de una enfermedad o afección en un sujeto humano, y el método comprende poner en contacto sangre completa, que constituye al menos un 10% del volumen total en una mezcla de reacción, con un antígeno y una cantidad limitante de agonista de TLR y medir la presencia o elevación del nivel de una molécula efectora inmunitaria de células T, en el que la presencia o el nivel de la molécula efectora inmunitaria es indicativo de la enfermedad o afección.
- También se describen kits para el uso con los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, se contempla un kit de inmunodetección. Además, se contempla un kit para el análisis de una muestra de un sujeto que tiene o que se sospecha que desarrolla una enfermedad inducida químicamente o por metales. De manera específica, se contempla un kit para el análisis de una muestra de un sujeto que tiene o que se sospecha que desarrolla una enfermedad. Se puede usar un kit para analizar la respuesta inmunitaria mediada por células de un sujeto antes o después de que se haya desarrollado una enfermedad o antes o después de que se administre un medicamento a un sujeto o se exponga a un agente tóxico o contaminante. Si también se emplea un antígeno, el kit también puede comprender un antígeno particular.
- Los reactivos de inmunodetección del kit pueden tomar cualquiera de una diversidad de formas, que incluyen los marcadores detectables que están asociados o unidos al anticuerpo o antígeno concreto, y los marcadores detectables que están asociados o unidos a un ligando de unión secundario. Los ligandos secundarios ejemplares son los anticuerpos secundarios que tienen afinidad de unión hacia el primer anticuerpo o antígeno, y los anticuerpos secundarios que tienen afinidad de unión hacia un anticuerpo humano.
- Los reactivos de inmunodetección adecuados adicionales para el uso en los presentes kits incluyen el reactivo de dos componentes que comprende un anticuerpo secundario que tiene afinidad de unión hacia el primer anticuerpo o antígeno, junto con un tercer anticuerpo que tiene afinidad de unión hacia el segundo anticuerpo, y el tercer anticuerpo está unido a un marcador detectable.
- Los kits pueden comprender además una composición alicuotada de manera adecuada de antígeno o molécula efectora, marcada o sin marcar, como se puede usar para preparar una curva patrón para un ensayo de detección.
- Los kits pueden contener conjugados anticuerpo-marcador en una forma completamente conjugada, en forma de intermedios, o como restos diferentes a conjugarse por parte del usuario del kit. Los componentes de los kits se pueden envasar en medios acuosos o en forma liofilizada.
- El medio recipiente de cualquiera de los kits incluye en general al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa u otro medio recipiente, en el que se puede colocar el agente de ensayo, el anticuerpo o antígeno, y, en general, alicuotarlo de manera adecuada. Cuando se proporciona un segundo o tercer ligando de unión o componente adicional, el kit también contendrá en general un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el que se puede colocar este ligando o componente. Los kits enseñados por la presente descripción también incluyen en general un medio para contener el anticuerpo, antígeno, y cualquier otro recipiente de reactivos en estrecha proximidad para la venta comercial. Tales recipientes pueden incluir recipientes plásticos moldeados por inyección o por soplado en los que se conservan los viales deseados.
- La referencia en la presente memoria a un "agonista de TLR" es una referencia al agonista de TLR-7/8 R848.
- Los aspectos enseñados en la presente memoria se describen adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos no limitantes.
- Ejemplo 1
- Desarrollo de un Ensayo*
- Las muestras de sangre heparinizada se recogen en un tubo al vacío (tubos Li-Hep Vacuette [Marca Registrada] (Greiner Bio-one, Alemania)).
- Se incubaron alicuotas de las muestras de sangre con diversas concentraciones de agonistas del receptor de tipo Toll: El compuesto de imidazoquinolina - ligando de TLR-7/8, R848 (GL Synthesis, Inc.), el ligando de TLR-2 Lipomanano (InvivoGen, San Diego), el ligando de TLR-2 Pam3CSK4 (InvivoGen, San Diego), el ligando de TLR-3 Poli (I:C) (InvivoGen, San Diego), el ligando de TLR-4 Lipopolisacárido (Sigma, Australia), y el ligando de TLR-9 oligodesoxinucleótidos de CpG (Hycult Biotechnology, Países Bajos); o los agonistas de receptores de células T: fitohemaglutinina (Cellistis Limited, Australia) anticuerpo anti-CD3 ϵ humano (clon de IgG₁ de ratón UCHT1; eBioscience, San Diego), y anticuerpos hacia el complejo de receptores de células T; o control de solución salina en varios tubos de recogida de sangre de diferentes tamaños recomendados por los fabricantes del ensayo QFT humano (Cellestis Limited, Australia). Los estimulantes independientes de receptores de células T incluyen el miristato-acetato de forbol (PMA), concanavalina A (ConA) y mitógeno de *Phytolacca americana*. Las alicuotas pueden ser volúmenes pequeños, tales como de 1 μ l a 1000 μ l, o volúmenes mayores tales como de 0,5 ml a 200 ml.
- En ciertos experimentos, se añade glucosa a diversas concentraciones a la sangre antes del inicio de la incubación.

5 Se incubaron muestras de sangre estimuladas durante 1 a 48 horas, lo que incluye 16-24 horas en presencia del antígeno y una cantidad limitante de un agonista de TLR a 37°C, tras lo cual se recogió el plasma por encima de las células sanguíneas depositadas. La cantidad de IFN-γ presente en cada muestra de plasma se cuantificó después mediante el uso del QFT ELISA (Cellestis Limited, Australia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La muestra de IFN-γ se cuantificó de manera alternativa mediante el uso del ensayo más sensible QFT-TB Gold ELISA (Cellestis Limited, Australia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los valores de la densidad óptica del ELISA para los patrones de IFN-γ analizados en cada placa de ELISA se usaron para construir una curva patrón a partir de la cual se convirtió la cantidad de IFN-γ presente en cada una de las muestras de plasma del ensayo en valores de IU/mL.

10 En una realización, se incubaron alícuotas de 1 ml de las muestras de sangre con diversas concentraciones de R848 (GL Synthesis Inc.) en tubos QFT-Nil de Cellestis Ltd, Australia, tal como se suministraron o con la adición de un grupo de péptidos que incluía la proteína EBNA1 del virus de Epstein-Barr (EBV) (JPT Peptide Technologies) o en tubos de CMV (QFT-CMV, Cellestis Ltd, Australia).

Ejemplo 2

15 *Respuestas de fondo a R848 en tubos QFT-Nil*

Se añadieron diversas concentraciones de R848 a 1 ml de sangre completa en tubos QFT-Nil. La sangre se incubó a 37°C durante 16-24 horas antes de centrifugar los tubos, y se determinó la concentración de IFNγ del plasma mediante ELISA (1IU/ml). La Figura 1 y la Tabla 3 muestran las respuestas de fondo para diversas concentraciones de R848, con los valores de la media y EEM representados para cada concentración.

20 Tabla 3

Concentración de R848

	0,01 µg/ml	0,02 µg/ml	0,025 µg/ml	0,03 µg/ml	0,04 µg/ml	0,05 µg/ml	0,1 µg/ml
Número de valores	31	16	5	16	16	44	15
Media	-0,009677	0,0100	0,0330	0,0925	0,5144	1,084	21,58
Desviación Est.	0,03060	0,05680	0,04894	0,2248	1,275	1,908	37,57
Error Est.	0,005497	0,01420	0,02189	0,05621	0,3188	0,2877	9,701

Este ejemplo demuestra que por debajo de 0,05 µg/ml de R848, las respuestas de fondo para R848 solo no son significativas en los tubos QFT-Nil. Cuando se añaden 0,1 µg/ml de R848 a los tubos QFT-Nil, se observan respuestas de fondo significativas en muchos donantes.

25 Ejemplo 3

Estimulación de las respuestas a antígenos tras la adición de R848 a los tubos QFT

30 Se añadieron diversas concentraciones de R848 a 1 ml de sangre completa en tubos QFT-Nil que contenían 0,5 µg/ml de PepMix de EBNA1 de EBV o tubos QFT-CMV. La sangre se incubó a 37°C durante 16-24 horas antes de centrifugar los tubos, y se determinó la concentración de IFNγ del plasma mediante ELISA (presentada como IU/ml). La Figura 2 y la Tabla 4 (EBV + R848) y la Figura 3 (CMV + R848) y la Tabla 5 muestran los valores individuales para cada donante, calculados como la respuesta a la combinación de antígeno + R848, menos las respuestas de fondo para la misma concentración de R848 solo. Por lo tanto, estos gráficos representan la estimulación de las respuestas al antígeno observadas tras la adición de R848. Los puntos de datos para donantes individuales están marcados, así como la media y el error estándar de la media para cada grupo de datos de concentraciones.

35 Tabla 4

<i>EBV + R848</i>				
	EBV	EBV + 0,01 µg/ml de R848	EBV + 0,05 µg/ml de R848	EBV + 0,1 µg/ml de R848
Número de valores	15	7	15	15
Media	1,080	2,857	18,32	29,57
Desviación Est.	1,132	3,621	31,05	37,03
Error Est.	0,2923	1,369	8,017	9,562

Tabla 5

<i>CMV + R848</i>			
	CMV	CMV + 0,05 µg/ml de R848	CMV + 0,1 µg/ml de R848
Número de valores	11	11	8
Media	9,496	15,96	79,53
Desviación Est.	18,34	29,91	92,84
Error Est.	5,530	9,018	32,82

5 Estos experimentos muestran que las respuestas a la mezcla de péptidos de EBNA1 de EBV y los péptidos de QFT-CMV se pueden estimular en presencia de R848. Para las respuestas a EBV existe una estimulación significativa cuando se añaden 0,05 µg/ml de R848. En los tubos de QFT-CMV, la estimulación en las respuestas a cuando se añaden 0,05 µg/ml de R848 no es tan grande como la observada para EBV. Sin embargo, la estimulación cuando se añaden 0,1 µg/ml de R848 es mucho mayor.

En conclusión, las respuestas a los estímulos combinados antígeno-R848 son mayores que las observadas al sumar individualmente las respuestas al antígeno y R848 solo.

Ejemplo 4

10 *Estudio clínico mediante el uso de R848 para aumentar la respuesta en QFT-TB en pacientes con sospecha de TB y en pacientes de TB*

15 Se ensayó R848 como estimulante en un tubo QFT-TB como parte de un estudio clínico. Para este estudio se incorporaron pacientes con TB activa (confirmada mediante cultivo), pacientes que se sospechaba que tenían TB y sus contactos domésticos (HHC). Además del QFT-TB Gold estándar en tubo, se emplearon dos ensayos adicionales con la adición de dos concentraciones diferentes de R848 (0,05 µg/ml y 0,01 µg/ml), ambas solas en tubos QFT-Nil y en combinación con el tubo QFT-TB actual.

Los datos de los pacientes se proporcionan en la Tabla 6.

Tabla 6

<i>Información de Pacientes</i>	
Sujeto	Número
TB Confirmada	14
Sospecha de TB	8
HHC	11
QFN positivos	30
QFN negativos	3
Total	33
Total evaluados	26*
(*6 pacientes no completaron los conjuntos de datos, y se excluyeron del análisis)	

20 La adición de R848 a 0,05 µg/ml y 0,1 µg/ml incrementó significativamente la respuesta para QFT-TB en los sujetos que mostraron una respuesta positiva para el ensayo QFT-TB solo ($P < 0,001$ y $P < 0,0001$, respectivamente) [Figura 4].

Dos de los pacientes que dieron resultados negativos con el tubo QFT-TB actual dieron resultados positivos cuando se añadió R848 al tubo (a ambas concentraciones ensayadas). Ambos pacientes fueron sospechosos de TB.

25 Los expertos en la técnica apreciarán los aspectos de la materia descrita. Se debe entender que la descripción abarca todas las variaciones y modificaciones. La descripción también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos referidos o indicados en esta memoria descriptiva, individualmente o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones de dos o más de las etapas o características.

Bibliografía

- Biggs *et al.* (1999) *Cytometry* 36:36-45
- Daneshvar *et al.* (1999) *J. Immunol. Methods* 226(1-2):119-128
- Durig *et al.* (1993) *J. Raman Spectrosc.* 24(5):281-285
- 5 Eriksson *et al.* (1993) *Biophys. J.* 2:64
- Fu *et al.* (1999) *Nature Biotechnology* 17:1109-1111
- Hemmi *et al.* (2002) *Nature Immunology* 3:196-200
- Lakowicz *et al.* (1997) *Biophys. J.* 72:567
- Lewis *et al.* (1999) *Dyes Pigm.* 42(2):197
- 10 Malemed *et al.* (1990) "*Flow cytometry and sorting*", 2ª Ed., Nueva York, Wiley-Liss
- Nowroozalizadeh *et al.* (2009) *Cytokine* 46:325-31
- Peel *et al.* (1985) *J Med Chem* 28:298-302
- Petkovic-Duran *et al.* (2009) *Biotechniques* 47:827-834
- Rahman *et al.* (1998) *J. Org. Chem.* 63:6196
- 15 Rapaport *et al.* (1999) *Appl. Phys. Lett.* 74(3):329-331
- Tawa *et al.*, *Mater. Res. Soc. Symp. Pro.* 488 [Electrical, Optical and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials IV], 885-890
- Youvan *et al.* (1997) *Biotechnology et alia* 3:1-18

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir la actividad de la respuesta inmunitaria mediada por células en un sujeto, y dicho método comprende poner en contacto linfocitos de una muestra de sangre obtenida del sujeto con un antígeno y un agonista R848 del receptor de tipo Toll (TLR) 7/8 a una concentración de 0,01 µg/ml a 0,1 µg/ml y medir la presencia o elevación del nivel de interferón-γ (IFN-γ) de los linfocitos, en el que la presencia o el nivel de IFN-γ es indicativo del nivel de respuesta mediada por células del sujeto.
2. El método de la Reivindicación 1, en el que el sujeto es un ser humano.
3. El método de la Reivindicación 1 o 2, en el que el sujeto ha tenido una exposición anterior al antígeno.
4. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, en el que la muestra de sangre es sangre completa sin diluir.
5. El método de la Reivindicación 4, en el que la sangre completa se recoge en un tubo que comprende heparina.
6. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1-5, en el que se detecta IFN-γ con anticuerpos específicos hacia IFN-γ.
7. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, en el que el sujeto tiene una infección por un agente patógeno seleccionado de la lista que consiste en el género *Mycobacterium*, género *Staphylococcus*, género *Streptococcus*, género *Borrelia*, *Escherichia coli*, género *Salmonella*, género *Clostridium*, género *Shigella*, género *Proteus*, género *Bacillus*, virus Herpes, virus de la Hepatitis B o C y virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).
8. El método de la Reivindicación 7, en el que el sujeto tiene una infección por *Mycobacterium tuberculosis*.
9. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, en el que el sujeto tiene una enfermedad seleccionada de la lista que consiste en alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, esclerosis múltiple, enfermedad autoinmunitaria de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, enfermedad de Behcet, penfigoide ampoloso, cardiomiopatía, celiaquía-dermatitis, síndrome de fatiga crónica (CFIDS), desmielinización inflamatoria crónica, polineuropatía inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad por crioaglutininas, enfermedad de Crohn, dermatitis herpetiforme, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, diabetes dependiente de insulina (Tipo I), liquen plano, lupus, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, miastenia gravis, miocarditis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitiligo y enfermedad inflamatoria intestinal.
10. El método de la Reivindicación 9, en el que la enfermedad es la enfermedad celíaca.
11. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, en el que el sujeto tiene un cáncer seleccionado del protooncogén ABL1, cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenoquístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnógena, alopecia, sarcoma alveolar de partes blandas, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres óseos, cáncer intestinal, glioma del tronco encefálico, tumores cerebrales y del SNC, cáncer de mama, tumores del SNC, tumores carcinoides, cáncer de cuello uterino, tumores cerebrales infantiles, cáncer infantil, leucemia infantil, sarcoma infantil de tejidos blandos, condrosarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cánceres colorrectales, linfoma de células T cutáneas, dermatofibrosarcoma protuberans, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de vías biliares extrahepáticas, cáncer de ojo, melanoma ocular, retinoblastoma, cáncer de trompas de Falopio, anemia de Fanconi, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor carcinoide gastrointestinal, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, neoplasias malignas hematológicas, leucemia de células peludas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, papilomavirus humano, mola hidatiforme, hipercalcemia, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, cáncer de células de islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer laríngeo, leiomiomasarcoma, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labio, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide maligno de riñón, meduloblastoma, melanoma, cáncer de células de Merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, mieloma, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome

- de Nijmegen, cáncer de piel distinto de melanoma, cáncer de pulmón de células no microcíticas (NSCLC), cánceres oculares, cáncer esofágico, cáncer de la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer ovárico con ostomía, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer de glándula parótida, cáncer de pene, tumores neuroectodérmicos periféricos, cáncer de hipófisis, policitemia vera, cáncer de próstata, cánceres infrecuentes y trastornos asociados, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, síndrome de Rothmund-Thomson, cáncer de glándula salival, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células microcíticas (SCLC), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, tumores de la médula espinal, carcinoma de células escamosas (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer testicular, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición (vejiga), cáncer de células de transición (pelvis renal/uréter), cáncer trofoblástico, cáncer uretral, cáncer del aparato urinario, uroplaquinas, sarcoma uterino, cáncer de útero, cáncer vaginal, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenström y tumor de Wilms.
- 5
- 10
12. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, en el que el sujeto se expuso a un agente tóxico.

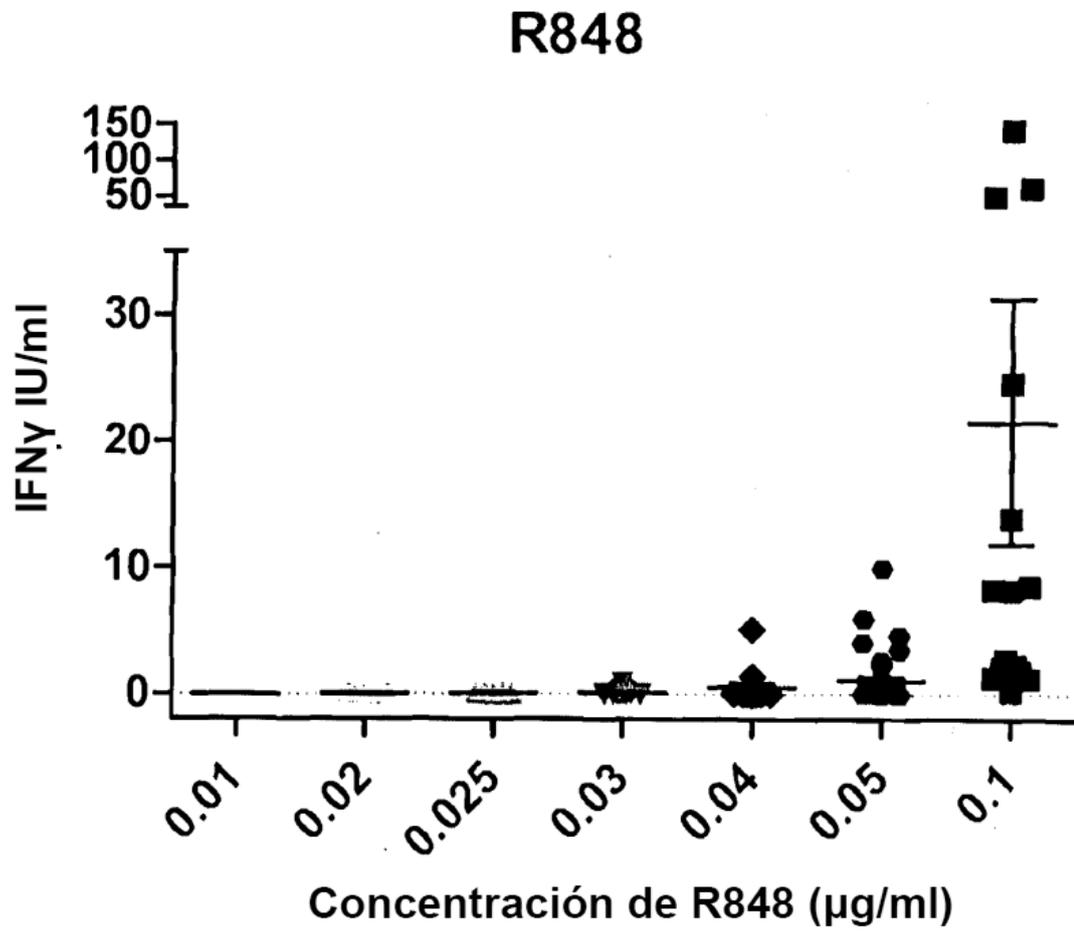


Figura 1

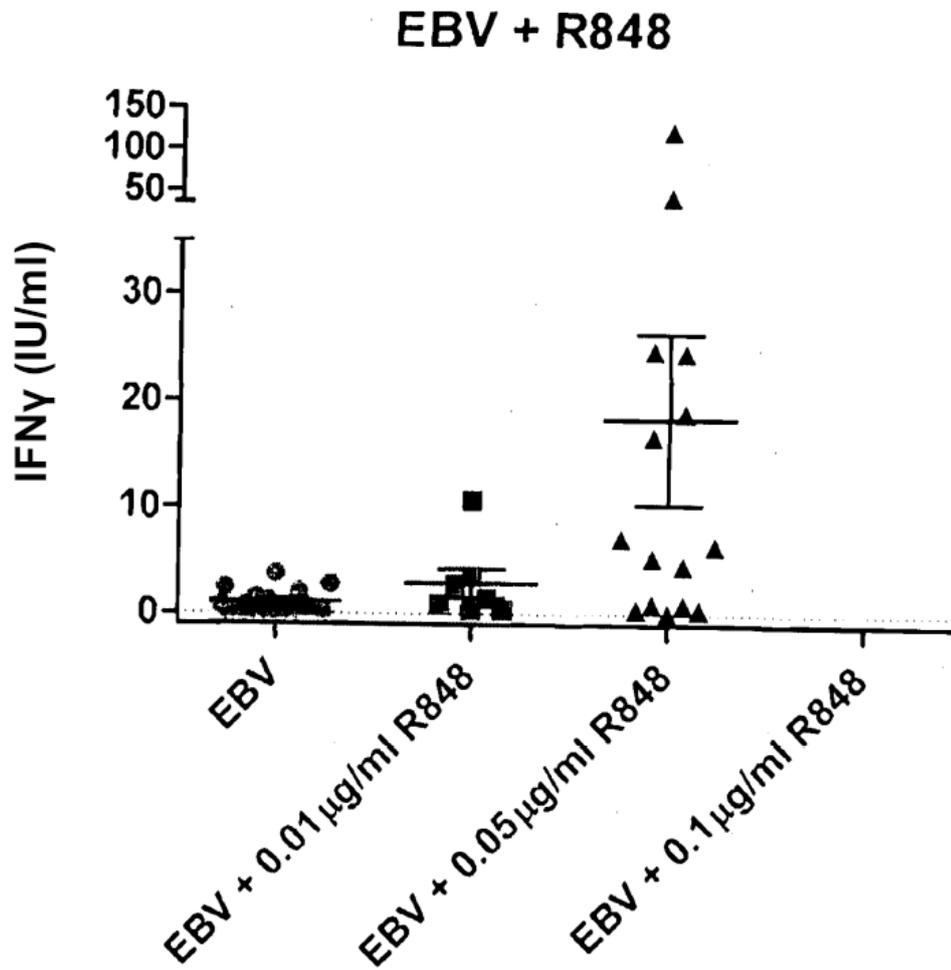


Figura 2

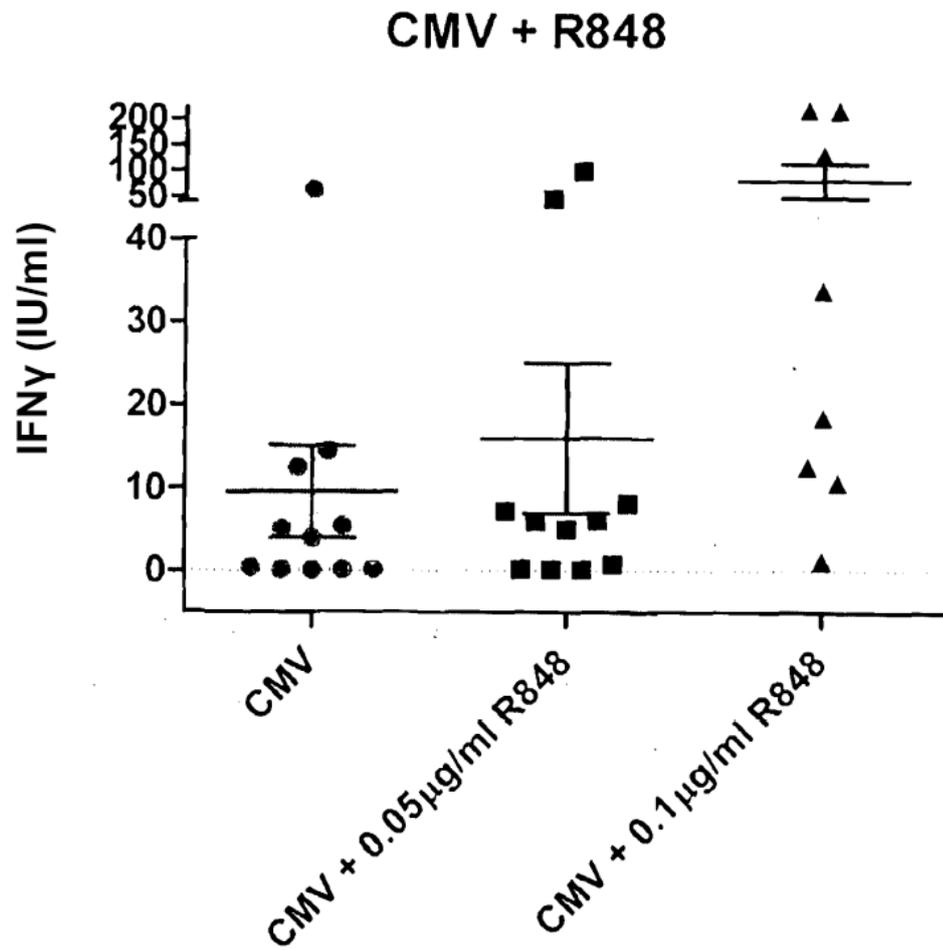


Figura 3

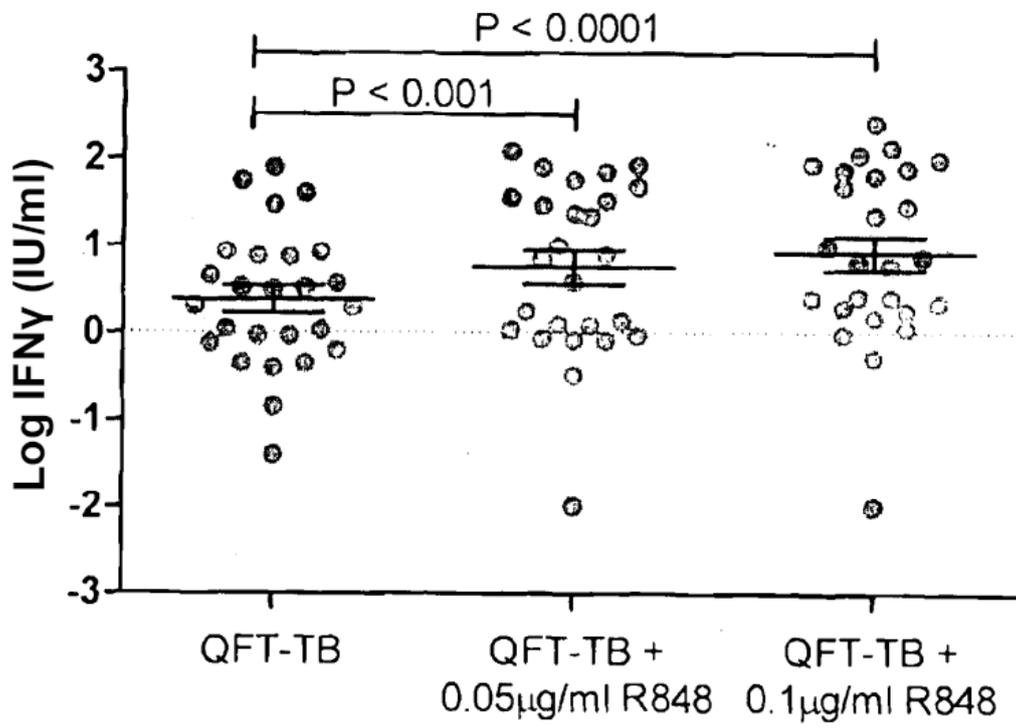


Figura 4