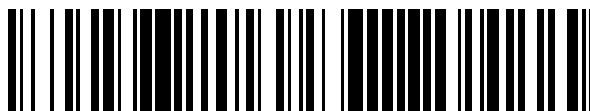


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 697**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2012 PCT/AU2012/000756**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO13000021**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2012 E 12804281 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2726883**

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

30 Prioridad:

**29.06.2011 US 201161502811 P**

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

**25.06.2018**

73 Titular/es:

**CELLESTIS LIMITED (100.0%)  
Level 1, Office Tower 2 Chadstone Centre 1341  
Dandenong Road  
Chadstone, Victoria 3148, AU**

72 Inventor/es:

**BOYLE, JEFF**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 673 697 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 con sensibilidad incrementada

**Campo**

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 el diagnóstico de la exposición de un sujeto a un antígeno basándose en la respuesta inmunitaria mediada por células con una sensibilidad incrementada. 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.

10 **Antecedentes**

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.

15 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.

20 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 basados en análisis inmunológicos no siempre son necesariamente lo suficientemente sensibles para detectar una infección de bajo grado o la presencia de una infección de bajo nivel persistente, o en sujetos con enfermedades infecciosas activas o latentes. Existe la necesidad de desarrollar ensayos de diagnóstico con una sensibilidad incrementada con respecto a la respuesta inmunitaria mediada por células.

25 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). Otro ensayo emplea antígenos peptídicos 15-méricos para estimular las células T. Sin embargo, los péptidos de esta longitud, aunque pueden ser detectados por las células T CD4<sup>+</sup>, son demasiado largos para ser detectados por las células T CD8<sup>+</sup>.

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

35 Los autores de Tully *et al.* (2005) *The Journal of Immunology*, 174:2174-2184 evalúan las respuestas de células T específicas de *Mycobacterium tuberculosis* después de estimularlas con péptidos CD4<sup>+</sup> y péptidos CD8<sup>+</sup> por separado. De forma similar, los autores de Maccalli *et al.* (2008) *Clin. Cancer Res.* 14(22):7292-7303 evalúan la respuesta de las células T de pacientes con cáncer colorrectal después de estimular con péptidos CD4<sup>+</sup> y péptidos CD8<sup>+</sup> por separado.

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

**Sumario de la invención**

45 La presente invención se refiere a un método para detectar una respuesta inmunitaria mediada por células en un sujeto, y el método comprende co-incubar linfocitos del sujeto con una combinación de dos grupos de péptidos derivados de un antígeno proteico, y los péptidos comprenden una combinación de un grupo de péptidos cada uno de una longitud de 7 a 14 aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD8<sup>+</sup> y un segundo grupo de péptidos con una longitud mayor de 15 aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD4<sup>+</sup>, lo que abarca la totalidad o parte del antígeno proteico, y después cribar con respecto a los niveles de las moléculas efectoras producidas por los linfocitos activados.

50 "7 a 14 aminoácidos" significa 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 aminoácidos. Esto se considera en la presente memoria un primer grupo de péptidos. "Mayor de 15 aminoácidos" significa de 16 a la longitud completa del antígeno proteico, lo que incluye de 16 a 50 aminoácidos. Esto se considera un segundo grupo de péptidos. El presente método no se debe limitar a qué grupo de péptidos se denomina primero o segundo. Cada grupo comprende desde al menos un péptido hasta una serie de péptidos solapantes.

La co-incubación de los péptidos de 7 a 14 aminoácidos y los péptidos mayores de 15 aminoácidos derivados del antígeno proteico con los linfocitos da como resultado un ensayo más sensible, que permite una detección más temprana de la estimulación de los linfocitos que la que sería posible de otra manera. La sensibilidad incrementada incluye al menos una detección incrementada un 10% de las moléculas efectoras en comparación con la co-incubación con un péptido individual en el intervalo de 7 a 14 aminoácidos o en el intervalo >15 aminoácidos derivado del antígeno, o el propio antígeno completo. La capacidad de incrementar la sensibilidad de un ensayo de la respuesta inmunitaria mediada por células también posibilita medios de detección menos sensibles de moléculas efectoras. Además, la magnitud de la respuesta inmunitaria mediada por células detectada en el ensayo de la invención se puede correlacionar con el estado, la progresión y/o la gravedad de la enfermedad. Por lo tanto, la presente descripción enseña un ensayo de una respuesta inmunitaria mediada por células en un sujeto.

Sin limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, los dos grupos de péptidos, los péptidos 7 a 14-méricos y los péptidos >15-méricos posibilitan la detección mediante células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Las células T CD4<sup>+</sup> reconocen los péptidos >15-méricos, y las células T CD8<sup>+</sup> reconocen los péptidos 7 a 14-méricos. Estos péptidos se pueden denominar en la presente memoria "péptidos CD4<sup>+</sup>" (péptidos >15-méricos) o "péptidos CD8<sup>+</sup>" (péptidos 7 a 14-méricos).

En un aspecto, la invención proporciona un método para medir la actividad de la respuesta inmunitaria mediada por células en un sujeto, y el método comprende la co-incubación de linfocitos del sujeto con una combinación de dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende uno o más péptidos de una longitud de 7 a 14 residuos de aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD8<sup>+</sup>, y un segundo grupo que comprende péptidos de 16 o más aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD4<sup>+</sup>, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, 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 hacia el antígeno.

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 constituye 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 constituye 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 celíaca, 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 ampolloso, 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, vitiligo 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 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 oostomía, 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 proteico.

En los aspectos anteriores, el antígeno es una proteína derivada del agente patógeno asociado a la enfermedad o cáncer, o es un agente tóxico.

También se proporciona un método implementado informáticamente 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 el estado de la respuesta inmunitaria mediada por células del usuario por medio de una red de comunicaciones, y la molécula efectora inmunitaria se mide después de la co-incubación de los linfocitos del sujeto con una combinación de dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende péptidos de una longitud de 7 a 14 residuos de aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD8<sup>+</sup>, y un segundo grupo que comprende péptidos de 16 o más residuos de aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD4<sup>+</sup>, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico;

(b) procesar los datos 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.

En una realización, el antígeno de tuberculosis es CFP10, ESAT-6, TB7.7 o TB37.6. En una realización, el sujeto está infectado con HIV. En una realización, los linfocitos se ponen en contacto con una combinación de péptidos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. También se proporciona una utilización en la que dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende péptidos de una longitud de 7 a 14 residuos de aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD8<sup>+</sup> y un segundo grupo que comprende péptidos de 16 o más residuos de aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD4<sup>+</sup>, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico en la fabricación de un ensayo de diagnóstico de la respuesta inmunitaria mediada por células mediante el método de co-incubación de una combinación de dichos dos grupos de péptidos con los linfocitos y detección de la presencia o elevación de moléculas efectoras.

## Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación gráfica en forma de un histograma que muestra las respuestas medias a QFN-TB o QFN-TB más una de las tres mezclas en todos los sujetos evaluables ( $n=41$ ). Se muestran los valores medios con el error estándar de la media. Se observó un incremento significativo de la respuesta con la adición de todas las mezclas de péptidos ( $P<0,001$ ) [prueba de Friedman con una prueba de comparación múltiple de Dunn]. El ensayo QFN-TB tuvo péptidos CD4<sup>+</sup> y una mezcla de péptidos 10-méricos (péptidos CD8<sup>+</sup>).

La Figura 2 es una representación gráfica de las respuestas de IFN- $\gamma$  en un ensayo QFT-CMV que comprendió péptidos 16-méricos hacia el antígeno pp65 de CMV (péptidos CD4<sup>+</sup>) mediante el uso de un tubo Nil sin antígeno de

CMV o péptidos 16-méricos CD4<sup>+</sup> solos; y péptido CD4<sup>+</sup> + CD8<sup>+</sup> de CMV combinado; y con el uso de un mitógeno como control.

### Descripción detallada

5 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.

10 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 antígeno" incluye un único antígeno, así como dos o más antígenos; la referencia a "la descripción" incluye aspectos individuales o múltiples enseñados por la presente descripción; y así sucesivamente. Los aspectos enseñados en la presente memoria están abarcados por el término "invención". Todos los aspectos de la invención están posibilitados dentro del alcance de las reivindicaciones. Las expresiones "células T" y "linfocitos T" se usan de manera intercambiable en la presente memoria. Una "célula inmunitaria" incluye un linfocito, tal como una célula T.

15 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 ensayo de múltiples partes puede tener una serie de péptidos solapantes de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos, y/o de una longitud mayor de 15 residuos de aminoácidos, que abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico hacia el cual se va a medir una respuesta inmunitaria mediada por células. Por lo tanto, 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.

20 La presente descripción contempla grupos de péptidos. El término "grupo" se puede sustituir por otros términos tales como "mezcla", "serie", "colección" y similares, sin apartarse del método descrito presentemente. Cada grupo comprende al menos un péptido, y en una realización incluye una serie de péptidos solapantes. Por lo tanto, un primer grupo puede contener una serie de péptidos solapantes de una longitud de 7 a 14 residuos de aminoácidos. Estos péptidos son reconocidos por las células T CD8<sup>+</sup> (péptidos CD8<sup>+</sup>). Un segundo grupo puede contener una serie de péptidos solapantes de una longitud mayor de 15 residuos de aminoácidos. Estos péptidos son reconocidos por las células T CD4<sup>+</sup> (péptidos CD4<sup>+</sup>). Además, los péptidos no tienen que ser necesariamente solapantes, o puede solaparse por un único aminoácido o múltiples aminoácidos. Los péptidos incluyen mezclas de péptidos que abarcan el 80-100% de un antígeno proteico. El "80-100%" significa 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%.

25 La referencia a una serie de péptidos solapantes de una longitud de 7 a 14 residuos de aminoácidos que abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico significa un péptido de una longitud de 7 residuos de aminoácidos a un máximo de 14 residuos de aminoácidos que en total abarca desde todos los residuos de aminoácidos hasta 6 residuos de aminoácidos de un antígeno proteico desde su extremo N-terminal hasta su extremo C-terminal o parte del mismo. Por lo tanto, si la longitud de un péptido determinado es una longitud de x residuos de aminoácidos, en la que x es de 7 a 14, el grado de solapamiento entre dos péptidos consecutivos es de x-1 a x-6. En una realización, el solapamiento de cada péptido consecutivo es x-1. Una serie de péptidos solapantes de una longitud mayor de 15 residuos de aminoácidos también abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, en el que cada péptido tiene una longitud de al menos 16 residuos de aminoácidos o hasta la longitud del antígeno proteico completo. En una realización, un péptido de una longitud mayor de 15 residuos de aminoácidos es de 16 a 50 aminoácidos, tal como 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 o 50 residuos de aminoácidos. Tal como se indica anteriormente, no existe la necesidad de que los péptidos solapen, con tal de que haya al menos un grupo de uno o más péptidos de 7 a 14 aminoácidos y otro grupo de al menos un péptido >15-mérico.

30 La presente descripción incluye el caso en el que cada péptido de la serie tiene la misma longitud (es decir, x). Sin embargo, la serie de péptidos puede comprender una mezcla de péptidos  $x_1, x_2, x_3, \dots, x_i$ , en la que cada uno de los péptidos  $x_i$  tiene una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos, o una longitud mayor de 15 residuos de aminoácidos.

35 En la presente memoria se posibilita un método para detectar una respuesta inmunitaria mediada por células en un sujeto, y el método comprende co-incubar linfocitos del sujeto con una combinación de al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, y después cribar con respecto a los niveles de las moléculas efectoras producidas por los linfocitos activados.

Los linfocitos se activan mediante la co-incubación de una combinación con al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico.

- 5 La presente descripción enseña el aumento de la producción de moléculas efectoras a partir de linfocitos expuestos a al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico. Tales linfocitos son linfocitos "activados" o "estimulados". El aumento se da exponiendo las células a al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico. El nivel de la respuesta es mayor en presencia del antígeno completo o un péptido derivado del antígeno que es menor de 7 aminoácidos o mayor de 14 aminoácidos. 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 monitorizar de otra manera una respuesta mediada por células en un sujeto midiendo la presencia o el nivel de las moléculas efectoras de células T estimuladas mediante al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico. El ensayo también posibilita la detección más temprana de la respuesta mediada por células. En una realización, el ensayo enseñado en la presente memoria aumenta 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.

- 25 De manera conveniente, los péptidos CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> se dividen en diferentes mezclas de péptidos.

Sin limitar la presente invención a ninguna teoría o modo de acción, dos grupos de péptidos posibilitan que se estimulen los epítomos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los péptidos se denominan en la presente memoria "péptidos CD4<sup>+</sup>" (péptidos >15-méricos) o "péptidos CD8<sup>+</sup>" (péptidos 7 a 14-méricos).

- 30 También se puede añadir un agente adicional a la mezcla de incubación, tal como 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 receptores de tipo Toll (TLR); y otros agentes moduladores de TLR.

- 35 Como se describe en la presente memoria, las células T-reg son células inhibitoras de la respuesta inmunitaria cuya actividad se inhibe.

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

- 40 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 agentes tóxicos proteicos. 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.

- 45 Por lo tanto, en la presente memoria se describe 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 al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, y medir el nivel de una molécula efectora inmunitaria producida por las células inmunitarias, en el que el nivel de la molécula efectora inmunitaria es indicativo del nivel de la respuesta inmunitaria mediada por células del sujeto.

- 55 Además, en la presente memoria se describe 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 al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, 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 proteico tóxico.

5 Además, en la presente memoria se describe 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 al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, 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  
10 la respuesta mediada por células y 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 proteico tóxico.

15 Todavía otro aspecto enseñado por la presente descripción es un ensayo para detectar la presencia, ausencia, nivel o etapa de una enfermedad o afección en un sujeto, y el método comprende poner en contacto linfocitos del sujeto con al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, 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 de la enfermedad o afección.

20 La presente descripción contempla además un método para determinar si un agente induce inmunodepresión en un sujeto, y el método comprende poner en contacto linfocitos del sujeto después de la exposición al agente con al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, y medir la presencia y el nivel  
25 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.

De acuerdo con este aspecto, el agente puede ser un medicamento o un agente tóxico ambiental.

30 De manera específica, los linfocitos están comprendidos en una muestra de sangre. La muestra de sangre se co-estimula con al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico.

35 También se proporciona la utilización de al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, en la fabricación de un ensayo de diagnóstico de la respuesta inmunitaria mediada por células mediante el método de co-incubar linfocitos con una cantidad limitante del agonista y detectar la presencia o elevación de una molécula efectora.

40 En otra descripción, en la presente memoria se enseña un método para detectar si una enfermedad está induciendo inmunodepresión en un sujeto, y el método comprende poner en contacto linfocitos del sujeto con una enfermedad con al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, y medir la presencia o el nivel de una molécula efectora inmunitaria de los linfocitos, en el que el nivel de la molécula efectora inmunitaria es indicativo del grado de inmunodepresión inducido o asociado con la enfermedad.

45 También se describe la utilización de al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, en la fabricación de un ensayo de diagnóstico de la respuesta inmunitaria mediada por células. En general, el método comprende incubar linfocitos con al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al  
50 menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico.

55 Esta utilización incluye la utilización 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 un agente proteico tóxico, tal como un agente tóxico ambiental. La medida de "una molécula efectora inmunitaria" incluye medir uno o más tipos diferentes de moléculas.

La presente descripción posibilita además un método para medir la actividad de la respuesta inmunitaria mediada por células en un sujeto, y el método comprende poner en contacto una célula T reguladora del sujeto con un agente

seleccionado de (i) un inhibidor de las células T reguladoras supresoras; y (ii) un activador de las células que aumentan la inmunidad, o un subgrupo de las mismas; y además poner en contacto las células T con al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, 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.

Los ejemplos de inhibidores o moduladores de la función de las células T-reg incluyen ligandos de CD25 tales como, pero sin limitación, un anticuerpo policlonal o monoclonal hacia CD25 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, anticuerpos policlonales o monoclonales humanizados o desinmunizados hacia CD25 o una forma recombinante o sintética de los anticuerpos policlonales o monoclonales. Otros ejemplos de agentes incluyen ácidos nucleicos directos o inversos y moléculas dirigidas hacia el mRNA o ADN (es decir, material genético) que codifica Janus Tirosina Quinasa 1 (JAK1) o Tirosina Quinasa 2 (TYK2), o moléculas pequeñas inhibitoras de las proteínas JAK1 o TYK2. La referencia a "moléculas pequeñas" incluye los receptores nuevos de antígenos de inmunoglobulinas (IgNARs) como se describe en la publicación de patente internacional nº WO 2005/118629. Los ejemplos adicionales de agentes adecuados son agentes estimuladores tales como moléculas de CpG que actúan por medio de receptores de tipo Toll (TLRs) y/u otros mecanismos. Por lo tanto, los oligonucleótidos que contienen CpG y un oligonucleótido que actúa como un agente modulador de TLR también forman parte de la presente descripción.

Se puede usar un único tipo de agente, o se pueden emplear dos o más tipos de agentes para modular las células T-reg. Por ejemplo, el ensayo se puede llevar a cabo con un ligando de CD25 y un oligonucleótido directo o inverso de JAK1/TYK2; un ligando de CD25 y un agente modulador de TLR; un oligonucleótido directo o inverso de JAK1/TYK2 y un agente modulador de TLR; o un ligando de CD25, un oligonucleótido directo o inverso de JAK1/TYK2 y un agente modulador de TLR. De manera alternativa, se emplea solamente un tipo de agente. En otra alternativa, se usa un oligonucleótido que comprende CpG y un agente modulador de TLR.

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 proteicos ambientales.

Las moléculas efectoras inmunitarias pueden ser cualquiera de una variedad de moléculas que se producen en respuesta a la activación o estimulación celular por un antígeno. Aunque un interferón (IFN), tal como IFN- $\gamma$ , es una molécula efectora inmunitaria especialmente útil, otras incluyen una diversidad de citocinas, tales como 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-1 $\alpha$  (IL-1F1), IL-1 $\beta$  (IL-1F2), IL-1 $\alpha$  (IL-1F3), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), un factor estimulante de colonias (CSF), tal como de granulocitos (G)-CSF o de granulocitos-macrófagos (GM)-CSF, el componente del complemento 5a (C5a), Gro $\alpha$  (CXCL1), sICAM-1 (CD54), IP-10 (CXCL10), I-TAC (CXCL11), MCP-1 (CCL2), MIF (GIF), MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4), RANTES (CCL5) o MIG (CXCL9).

La presente descripción también posibilita 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 al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, y medir el 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.

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, la exposición a un medicamento, la exposición a un agente proteico tóxico y una inmunodeficiencia o inmunodepresión, tal como la inducida por una enfermedad.

5 En una realización, 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. A pesar de que se contempla especialmente la sangre completa y es la muestra más adecuada, la presente descripción se amplía a otras muestras que contienen células inmunitarias, tales como líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, líquido tisular y fluido respiratorio, que incluye el fluido nasal y pulmonar, así como las muestras que se han sometido a reducción de células. 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".

20 Los volúmenes de sangre pueden ser de alrededor de 0,5  $\mu$ l a 200 ml. Los ejemplos incluyen 0,5  $\mu$ l, 1  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, 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.

25 Por lo tanto, en la presente memoria se describe un método de mezcla de uno o más linfocitos y al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, en un recipiente, y el método comprende proporcionar de alrededor de 0,5  $\mu$ l a 150  $\mu$ l de líquido que comprende los componentes en el recipiente para establecer una discontinuidad en la impedancia acústica, y aplicar una señal acústica para provocar la mezcla en el líquido. También se puede aplicar una 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.

30 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).

40 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.

45 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 peptídicos en el punto de asistencia, tal como los consultorios médicos, clínicas, 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- $\gamma$  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.

50 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, 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.

55 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 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 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.

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*, 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 parásitos incluyen el género *Plasmodium*, dermatofitos, parásitos hepáticos y similares. Otros agentes patógenos incluyen células eucarióticas tales como levaduras y hongos.

En una realización, el antígeno de tuberculosis es CFP10, ESAT-6, TB7.7 o TB37.6. En una realización, el sujeto está infectado con HIV.

El método según la presente invención es especialmente útil para el cribado de la exposición a *M. tuberculosis*. Por lo tanto, la presente descripción enseña 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 al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, en el que el antígeno se selecciona de CFP10, ESAT-6, TB7.7 y TB37.6 de *Mycobacterium tuberculosis*, y medir el nivel de una molécula efectora inmunitaria producida por las células inmunitarias, en el que el nivel de la molécula efectora inmunitaria es indicativo del nivel de la respuesta inmunitaria mediada por células del sujeto hacia *M. tuberculosis*.

CFP10 también se conoce como proteína eesxB de tipo ESAT-6 y la proteína antigénica secretada MTSA-10. ESAT-6 es un objetivo antigénico secretor temprano de seis kDa de *M. tuberculosis*. Otros antígenos proteicos objetivos adecuados para *M. tuberculosis* incluyen TB7.7 y TB37.6.

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 descripción 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.

5 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 agnogenética, 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.

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.

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.

50 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.

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.

5 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.

10 Otro aspecto descrito en la presente memoria, por lo tanto, es un método para detectar una molécula efectora inmunitaria en una muestra que comprende linfocitos de un sujeto, y el método comprende 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-efector, y después detectar el complejo, en el que la molécula efectora inmunitaria se genera después de la incubación de los linfocitos con al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico.

15 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.

25 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.

30 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, poliacrilamida, 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.

35 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.

40 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.

Tabla 1

<i>Lista de fluoróforos adecuados</i>		
Sonda	Ex <sup>1</sup> (nm)	Em <sup>2</sup> (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

<i>Lista de fluoróforos adecuados</i>		
Sonda	Ex <sup>1</sup> (nm)	Em <sup>2</sup> (nm)
BODIPY-FL	503	512
TRITC	547	574
X-Rodamina	570	576
Lisamina Rodamina B	570	590
PerCP	490	675
Rojo Texas	589	615
Alofococianina (APC)	650	660
TruRed	490, 675	695
Alexa Fluor 350	346	445
Alexa Fluor 430	430	545
Alexa Fluor 488	494	517
Alexa Fluor 532	530	555
Alexa Fluor 546	556	573
Alexa Fluor 555	556	573
Alexa Fluor 568	578	603
Alexa Fluor 594	590	617
Alexa Fluor 633	621	639
Alexa Fluor 647	650	688
Alexa Fluor 660	663	690
Alexa Fluor 680	679	702
Alexa Fluor 700	696	719
Alexa Fluor 750	752	779
Cy2	489	506
Cy3	(512); 550	570; (615)
Cy3,5	581	596; (640)
Cy5	(625); 650	670
Cy5,5	675	694
Cy7	743	767
Sondas de ácido nucleico		
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

Lista de fluoróforos adecuados		
Sonda	Ex <sup>1</sup> (nm)	Em <sup>2</sup> (nm)
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
<sup>1</sup> Ex: Longitud de onda de excitación máxima (nm)		
<sup>2</sup> 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.

5

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.

10

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.

5 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.

10 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.

15 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 dicroicos, 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.

20 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).

25 Tabla 2

<i>Parámetros ópticos ejemplares que se pueden medir con un citómetro de flujo.</i>			
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°	510-540†
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			

30 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.

35 El ensayo descrito 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



5 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.

10 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.

15 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.

20 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 al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, y el equipo y/o programa informático para facilitar la determinación y la transmisión de los informes a un médico.

25 Por ejemplo, la presente invención se refiere a un método implementado informáticamente para permitir que un usuario determine el estado de la respuesta inmunitaria mediada por células de un sujeto, y el método incluye:

30 (a) recibir datos en forma de niveles o concentraciones de una molécula efectora inmunitaria que, respecto de un control, proporcionan una correlación con el estado de la respuesta inmunitaria mediada por células en un sujeto, por medio de una red de comunicaciones, y la molécula efectora inmunitaria se mide después de la co-incubación de los linfocitos del sujeto con una combinación de dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende péptidos de una longitud de 7 a 14 residuos de aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD8<sup>+</sup>, y un segundo grupo que comprende péptidos de 16 o más residuos de aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD4<sup>+</sup>, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico;

35 (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.

40 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.

45 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

50 (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:

(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:

5 (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:

10 (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.

15 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.

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.

20 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:

25 (c) recibir los datos del sujeto del usuario por medio 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 el estado de la respuesta inmunitaria mediada por células, en el que la molécula efectora inmunitaria se determina después de la exposición de los linfocitos a al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y/o un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico;

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

(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.

35 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:

(a) un primer sistema de procesamiento adaptado para:

(i) recibir los datos; y

40 (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.

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.

5 De acuerdo con esta descripción, 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.

15 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.

20 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.

25 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 después de la exposición de los linfocitos a al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico. 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.

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

35 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.

40 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).

45 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.

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.

10 En una realización, la presente 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 al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico;

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.

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 concentraciones de los efectores inmunitarios tras la estimulación mediante una serie de péptidos solapantes de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos que abarcan la longitud completa de un antígeno proteico. 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 Un aspecto de la presente descripción incluye experimentos que demuestran la respuesta inmunitaria mediada por células de un sujeto midiendo la respuesta a al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico. En una realización, se pueden obtener una o más muestras, tales como una muestra de sangre periférica, una fracción enriquecida en leucocitos de la sangre o un lavado broncoalveolar, de un sujeto que tiene o que se sospecha que desarrolla una enfermedad particular (p.ej., una enfermedad autoinmunitaria, una infección por un agente patógeno o la exposición a un agente tóxico proteico), y la respuesta inmunitaria se mide mediante la determinación de las moléculas efectoras de las células T efectoras (p.ej., células T CD4<sup>+</sup> y células T CD8<sup>+</sup>).

55 Los métodos de unión inmunitaria incluyen los métodos para detectar o cuantificar la cantidad de un componente reactivo en una muestra, cuyos métodos requieren la detección o cuantificación de cualquier complejo inmunitario formado durante el proceso de unión. En la presente memoria, se obtendría una muestra que se sospecha que contiene una citocina tras la estimulación de los linfocitos mediante al menos dos grupos de péptidos, un primer

grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, 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.

5 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  
10 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.

En una realización particular, 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  
15 completa, que constituye al menos un 10% del volumen total en una mezcla de reacción, con al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, 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  
20 indicativo de la enfermedad o afección.

En una realización adicional, la presente descripción posibilita kits para el uso con los métodos descritos anteriormente. En una realización, se contempla un kit de inmunodetección. En otra realización, se contempla un kit para el análisis de una muestra de un sujeto que tiene o que se sospecha que desarrolla una enfermedad inducida  
25 químicamente o por metales. En una realización más particular, se contempla un kit para el análisis de una muestra de un sujeto que tiene o que se sospecha que desarrolla una enfermedad. En una realización, un kit es 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.

40 Los kits pueden contener conjugados anticuerpo-marcador en una forma completamente conjugada, en forma de intermedios, o como restos diferentes a conjugar 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, péptidos derivados de un 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.

También se contempla en la presente memoria un ensayo mejorado para detectar una respuesta inmunitaria mediada por células o el nivel de la misma en un sujeto, y el ensayo comprende incubar linfocitos del sujeto con un antígeno y detectar la presencia o elevación de las moléculas efectoras, y la mejora comprende incubar los linfocitos con al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de  
55 alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico.

La presente descripción proporciona además un método de tratamiento de un sujeto que tiene una infección por patógenos, un trastorno autoinmunitario o cáncer o una propensión a desarrollar tal afección o trastorno, y el método

comprende poner en contacto una fuente de linfocitos del sujeto con al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, 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 del nivel de la respuesta mediada por células del sujeto, que es indicativo de la presencia, ausencia, nivel o estado de la afección o trastorno, y después tratar la afección o trastorno.

Los aspectos enseñados en la presente memoria se describen adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos.

#### Ejemplo 1

##### 10 *Desarrollo de un Ensayo*

Las muestras de sangre heparinizada se recogen en tubos Li-Hep Vacuette [Marca Registrada] (Greiner Bio-one, Alemania).

Se incubaron alícuotas de las muestras de sangre con al menos dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende al menos un péptido de una longitud de alrededor de 7 a 14 residuos de aminoácidos (que reconoce las células T CD8<sup>+</sup>) y un segundo grupo que comprende al menos un péptido de 16 o más residuos de aminoácidos (que reconoce las células T CD4<sup>+</sup>), cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, en el que el antígeno se selecciona de CFP10, ESAT-6, TB7.7 y TB37.6 de *M. tuberculosis*.

En ciertos experimentos, se añade glucosa a diversas concentraciones a la sangre antes del inicio de la incubación.

Se incubaron muestras de sangre estimuladas durante 1 a 48 horas, lo que incluye 16-24 horas en presencia de los péptidos del antígeno a 37 °C, tras lo cual se recogió el plasma por encima de las células sanguíneas depositadas. La cantidad de IFN- $\gamma$  presente en cada muestra de plasma se cuantificó después mediante el uso del ELISA Quantiferon-TB [Marca Registrada] (Cellestis Limited, Australia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El IFN- $\gamma$  de la muestra se cuantificó de manera alternativa mediante el uso del ELISA Quantiferon-TB Gold [Marca Registrada] (Cellestis Limited, Australia), más sensible, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

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

#### Ejemplo 2

##### 30 *Respuestas de refuerzo en los tubos QuantiFERON-TB mediante la adición de péptidos específicos de TB CD8<sup>+</sup> a los péptidos CD4<sup>+</sup>*

Estos estudios se llevaron a cabo en un grupo de pacientes con una infección por tuberculosis activa confirmada clínicamente. Los pacientes se ensayaron con el ensayo de diagnóstico actual QuantiFERON-TB In-Tube. El tubo QuantiFERON-TB contiene mezclas de péptidos específicos para las células T CD4<sup>+</sup> (péptidos > 15-méricos). Los pacientes también se ensayaron mediante el uso de un tubo modificado en el que se habían añadido mezclas de péptidos específicos para las células T CD8<sup>+</sup> (péptidos 10-méricos). Estos péptidos adicionales se ensayaron como una mezcla completa de 91 péptidos, y como dos mezclas más pequeñas. Estas mezclas también se añadieron a tubos QuantiFERON-*Nil* como controles para evaluar las respuestas de fondo a estos péptidos solos.

En los pacientes con enfermedad activa por TB, la adición de los péptidos CD8<sup>+</sup> a los tubos QuantiFERON-TB dio como resultado un incremento del 10% de la sensibilidad en comparación con el ensayo QuantiFERON-TB actual.

#### 40 Ejemplo 3

##### *Diagnóstico de TB mediante el uso de mezclas de péptidos de CF10*

El objetivo de este Ejemplo fue ensayar si los antígenos de TB, diseñados para ser reconocidos por las células T CD8<sup>+</sup> (péptidos 10-méricos), son capaces de inducir la producción de niveles detectables de IFN- $\gamma$  en la sangre de pacientes con una infección activa por TB. Se propuso que el uso de péptidos restringidos a la clase I del MHC (denominados "péptidos CD8<sup>+</sup>") solos, o junto con los péptidos actuales, mejoraría la sensibilidad del diagnóstico de TB. Esto es especialmente importante en los individuos infectados por HIV, que tienen un número reducido de células T CD4<sup>+</sup>.

Se mezcló un total de 91 péptidos, cada uno de una longitud de 10 aminoácidos, que cubrían la longitud completa de la proteína CFP10 de *Mtb* en tres mezclas. La Mezcla 1 contuvo los 91 péptidos, la Mezcla 2 contuvo los péptidos que cubrían la primera mitad de la proteína CFP10 (péptidos 1-45), y la Mezcla 3 contuvo los péptidos que cubrían la segunda mitad de la proteína CFP10 (péptidos 46-91). Las mezclas se ensayaron solas (se añadieron a un tubo *Nil*) o en combinación con el tubo de antígeno QFT-TB Gold actual.

En total, se incorporaron 63 pacientes. De estos, 50 pacientes dieron resultados positivos en el ensayo QuantiFERON-TB Gold In-Tube. Se incorporaron 31 pacientes que tuvieron una enfermedad activa por TB confirmada mediante cultivo (o síntomas clínicos en un caso), y 19 pacientes incorporados fueron sospechosos de TB.

5 *Información de pacientes:*

Enfermos de TB: 31 (uno no confirmado mediante cultivo)

Sospechosos de TB: 19

HHC: 13

Nº total de pacientes: 63

10 Los resultados se muestran en las Tablas 3 a 7 y en la Figura 1, y muestran los resultados cualitativos para las mezclas de péptidos ensayadas en combinación con un tubo de antígeno QFT-TB Gold.

Tabla 3

<i>Pacientes enfermos de TB (n=31):</i>				
	QFT-TB Gold	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
Indeterminado	0	0	0	0
Negativo	3	0	1	
Positivo	28	31	30	31
<i>Sensibilidad</i>	<i>90%</i>	<i>100%</i>	<i>97%</i>	<i>100%</i>

Tabla 4

<i>Sospechosos de TB (n=19):</i>				
	QFT-TB Gold	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
Indeterminado	0	0	0	0
Negativo	9	7	6	7
Positivo	10	12	13	12

Tabla 5

<i>Pacientes de HHC (n=3):</i>				
	QFT-TB Gold	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
Indeterminado	0	0	0	0
Negativo	0	0	0	0
Positivo	3	3	3	3

15 Se llevó a cabo un análisis cuantitativo para examinar el efecto de añadir las mezclas de péptidos CD8<sup>+</sup> a tubos existentes de péptidos CD4<sup>+</sup>, con respecto al refuerzo de la respuesta de IFN- $\gamma$ , en comparación con un tubo de antígeno QFT-TB Gold solo. Un refuerzo en la respuesta de IFN- $\gamma$  se definió como un incremento > 1,5 veces del resultado de QFN TB. Los pacientes evaluables excluyen aquellos con una respuesta que se convirtió/revirtió, o en los que no todas las muestras de plasma fueron cuantificables. La Figura 1 indica la respuesta media de IFN- $\gamma$

20 respecto del QFT-TB solo o en combinación con cada mezcla.

Tabla 6

<i>Pacientes Evaluables enfermos de TB (n=24):</i>			
	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
Refuerzo (>1,5x resultado con QFN TB)	17	20	19
Sin refuerzo	6	4	5

<i>Pacientes Evaluables enfermos de TB (n=24):</i>			
	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
% de Refuerzo (de los pacientes evaluables)	74%	83%	79%

Tabla 7

<i>Sospechosos de TB Evaluables (n=6):</i>			
	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
Refuerzo (>1,5x resultado con QFN TB)	0	0	0
Sin refuerzo	6	6	6
% de Refuerzo (de los pacientes evaluables)	0%	0%	0%

Estos datos indican que la adición de los péptidos CD8<sup>+</sup> al ensayo actual QFT-TB Gold In Tube (que contiene péptidos CD4<sup>+</sup>) da como resultado un incremento del 10% de la sensibilidad del ensayo. Además, los datos indican que un incremento de la magnitud de la respuesta ("refuerzo") de más de 1,5 veces resultante de la adición de los péptidos CD8 solamente es evidente cuando el ensayo se lleva a cabo con muestras de pacientes derivadas de sujetos con enfermedad activa por TB confirmada. Estos datos indican que la adición de péptidos CD8 al ensayo actual QFT-TB Gold In Tube diferencia entre los sujetos con enfermedad activa por TB frente a la latente.

Ejemplo 4

*Efecto de los péptidos CD8<sup>+</sup> de CFP10 sobre la especificidad del ensayo*

El objetivo de este Ejemplo fue investigar si la adición de los péptidos CD8<sup>+</sup> de CFP10 al tubo de QFT-TB Gold dio como resultado una reducción de la especificidad del ensayo. Por lo tanto, se usaron mezclas de péptidos junto con el ensayo QFT-TB Gold In Tube (que contiene péptidos CD4<sup>+</sup>) en una población de donantes de control sanos incorporados de un país con una incidencia baja de TB (Melbourne, Australia).

Se mezcló un total de 91 péptidos, cada uno de una longitud de 10 aminoácidos, que cubrían la longitud completa de la proteína CFP10 de *Mtb* en tres mezclas. La Mezcla 1 contuvo los péptidos que cubrían la primera mitad de la proteína CFP10 (péptidos 1-45), la Mezcla 2 contuvo los péptidos que cubrían la segunda mitad de la proteína CFP10 (péptidos 46-91), y la Mezcla 3 contuvo los 91 péptidos.

En total, se incorporaron 92 sujetos. De estos, 3 sujetos dieron resultados positivos en el ensayo QuantiFERON-TB Gold In-Tube. Ningún sujeto negativo en QFT-TB mostró respuesta a ninguna de las mezclas de péptidos. Los resultados se muestran en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8

	QFT-TB Gold	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
Indeterminado	0	0	0	0
Negativo	89	89	89	89
Positivo	3	3	3	3

De los 3 donantes positivos para QFT-TB, no se observó un refuerzo de la respuesta de IFN-γ con la adición de las mezclas de péptidos (incremento > 1,5 veces del resultado de QFN TB).

Tabla 9

	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3
Refuerzo (>1,5x resultado con QFN TB)	0	0	0
Sin refuerzo	3	3	3
% de Refuerzo (de los pacientes evaluables)	0%	0%	0%

Estos datos indican que la adición de los péptidos CD8<sup>+</sup> al ensayo actual QFT-TB Gold In Tube no afecta negativamente a la especificidad del ensayo.



Ejemplo 5

*Combinación de un péptido CD4<sup>+</sup> 16-mérico de CMV con péptidos CD8<sup>+</sup> en un ensayo QFT-CMV*

Este Ejemplo investigó si la adición de los péptidos CD8<sup>+</sup> incrementó la respuesta en un ensayo QFT-CMV mediante el uso de un péptido 16-mérico del antígeno pp65 de CMV.

- 5 Se usó sangre de tres donantes sanos, con un resultado serológico positivo para CMV, en el ensayo QFT-CMV con la adición de 1) un tubo Nil que contenía 1 µg/ml (concentración final) del péptido 16-mérico, y 2) un tubo QFT-CMV con la adición de 1 µg/ml (concentración final) del péptido 16-mérico. El ensayo se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante.
- 10 0/3 donantes respondieron al péptido 16-mérico solo. 3/3 donantes respondieron al péptido 16-mérico + péptidos CD8<sup>+</sup> en el ensayo QFT-CMV. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 1 más adelante.
- No se observó una respuesta al péptido 16-mérico en ningún donante. Todos los donantes mostraron una respuesta positiva al péptido 16-mérico en combinación con los péptidos CD8<sup>+</sup> en el ensayo QFT-CMV.

**Bibliografía**

- Biggs *et al.* (1999) *Cytometry* 36:36-45
- 15 Daneshvar *et al.* (1999) *J. Immunol. Methods* 226(1-2):119-128
- Durig *et al.* (1993) *J. Raman Spectrosc.* 24(5):281-285
- Eriksson *et al.* (1993) *Biophys. J.* 2:64
- Fu *et al.* (1999) *Nature Biotechnology* 17:1109-1111
- Lakowicz *et al.* (1997) *Biophys. J.* 72:567
- 20 Lewis *et al.* (1999) *Dyes Pigm.* 42(2):197
- Maccalli *et al.* (2008) *Clin. Cancer Res.* 14(22):7292-7303
- Malemed *et al.* (1990) *"Flow cytometry and sorting"*, 2<sup>a</sup> Ed., Nueva York, Wiley-Liss
- Petkovic-Duran *et al.* (2009) *Biotechniques* 47:827-834
- Rapaport *et al.* (1999) *Appl. Phys. Lett.* 74(3):329-331
- 25 Rahman *et al.* (1998) *J. Org. Chem.* 63:6196
- Tawa *et al.* *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 488 [Electrical, Optical and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials IV], 885-890
- Tully *et al.* (2005) *The Journal of Immunology*, 174:2174-2184
- 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 la co-incubación de linfocitos del sujeto con una combinación de dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende péptidos de una longitud de 7 a 14 residuos de aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD8<sup>+</sup>, y un segundo grupo que comprende péptidos de 16 o más residuos de aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD4<sup>+</sup>, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico, 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.
2. El método de la Reivindicación 1, en el que el sujeto es un ser humano.
3. El método de la Reivindicación 1, en el que los linfocitos del sujeto están comprendidos en una muestra de sangre, y la muestra es sangre completa sin diluir, o en el que la muestra es sangre completa que constituye del 10% al 100% en volumen de la muestra a ensayar, en particular en el que la sangre completa constituye del 50% al 100% en volumen de la muestra a ensayar, más en particular en el que la sangre completa constituye del 80% al 100% en volumen de la muestra a ensayar.
4. El método de la Reivindicación 3, en el que la sangre completa se recoge en un tubo que comprende heparina.
5. El método de la Reivindicación 1, en el que la molécula efectora inmunitaria es una citocina, en particular en el que la citocina es IFN- $\gamma$ .
6. El método de la Reivindicación 1, en el que los efectores inmunitarios se detectan con anticuerpos específicos hacia los mismos, en particular en el que los efectores inmunitarios se detectan mediante el uso de ELISA, más en particular en el que los efectores inmunitarios se detectan mediante el uso de ELISpot.
7. El método de la Reivindicación 1, en el que el sujeto tiene una infección por un agente patógeno seleccionado del 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) o una enfermedad que resulta de ellas, en particular en el que la enfermedad es una infección por *Mycobacterium tuberculosis* o tuberculosis (TB) por ejemplo, en el que el antígeno se selecciona de CFP10, ESAT-6, TB7.7 y TB37.6.
8. El método de la Reivindicación 1, en el que el sujeto tiene una enfermedad seleccionada de 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, vitiligo y enfermedad inflamatoria intestinal, o la enfermedad es enfermedad celíaca, o la enfermedad es diabetes autoinmunitaria.
9. El método de la Reivindicación 1, 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, leiomioma, 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
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
10. El método de la Reivindicación 1, en el que el sujeto estuvo expuesto a un agente tóxico proteico.
  11. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 10, en el que la magnitud de la respuesta inmunitaria mediada por células se correlaciona con el estado, la progresión y/o la gravedad de una enfermedad.
  12. La utilización de dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende péptidos de una longitud de 7 a 14 residuos de aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD8<sup>+</sup> y un segundo grupo que comprende péptidos de 16 o más residuos de aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD4<sup>+</sup>, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico en la fabricación de un ensayo de diagnóstico de la respuesta inmunitaria mediada por células mediante el método de co-incubación de una combinación de dichos dos grupos de péptidos con los linfocitos y detección de la presencia o elevación de moléculas efectoras.
  13. Un método implementado informáticamente 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 el estado de la respuesta inmunitaria mediada por células del usuario por medio de una red de comunicaciones, y la molécula efectora inmunitaria se mide después de la co-incubación de los linfocitos del sujeto con una combinación de dos grupos de péptidos, un primer grupo que comprende péptidos de una longitud de 7 a 14 residuos de aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD8<sup>+</sup>, y un segundo grupo que comprende péptidos de 16 o más residuos de aminoácidos que son reconocidos por los linfocitos CD4<sup>+</sup>, cuyos péptidos abarcan la totalidad o parte de un antígeno proteico;
    - (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.

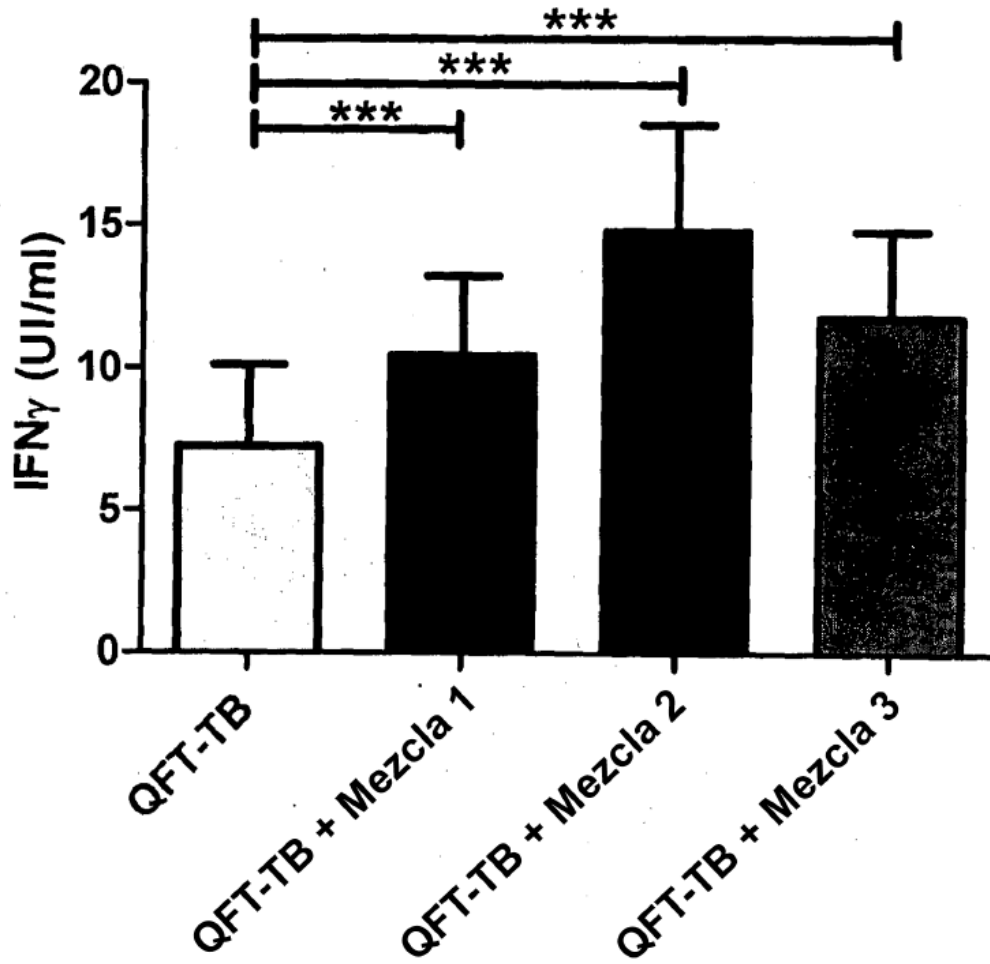


Figura 1

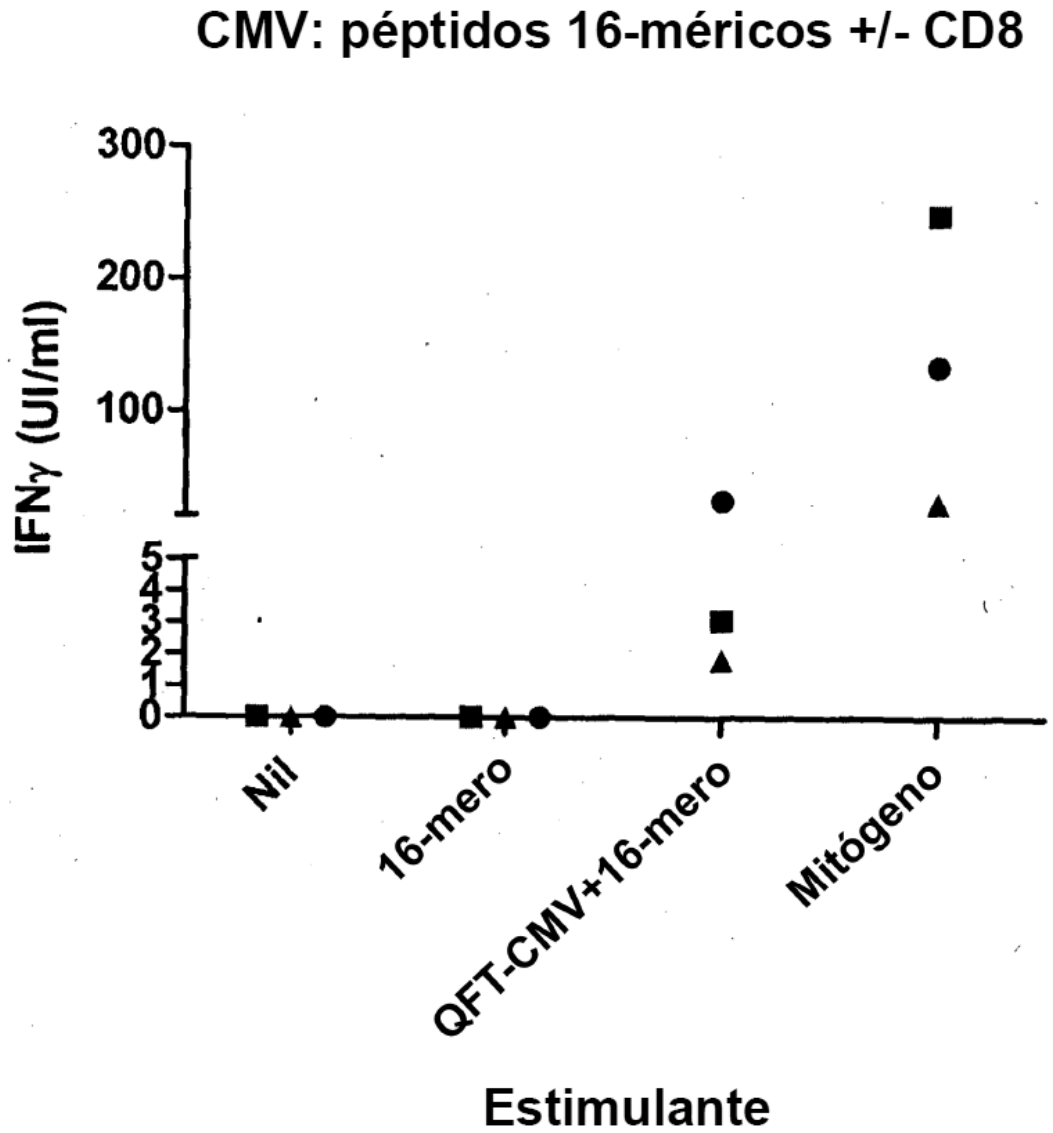


Figura 2