

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 723**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/AU2013/001509**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14100853**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13869475 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2939025**

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

30 Prioridad:

28.12.2012 US 201261746965 P
10.05.2013 EP 13167355

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.08.2018

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;
KNIGHTS, ASHLEY y
MUNIAN, CARMEN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 677 723 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 inmunológica mediada por células

Campo de la invención

5 Esta descripción se refiere, en general, al campo de los ensayos con base inmunológica y describe métodos para medir la capacidad de respuesta inmunológica mediadas por células. La presente descripción divulga métodos, composiciones y kits para medir la actividad de respuesta inmunológica mediada por células con mayor sensibilidad y mejor estabilidad durante la conservación.

Antecedentes de la invención

10 Los ensayos de diagnóstico con base inmunológica tienen una amplia aplicación en el campo médico. En particular, son herramientas importantes para ayudar a la detección y el control de una diversidad de trastornos de enfermedad. La eficacia de estos tipos de ensayos se basa, en parte, en la especificidad de los componentes dentro del sistema inmunológico, tales como los linfocitos T. A pesar de esta especificidad, los diagnósticos con base inmunológica no son necesariamente lo suficiente sensibles como para detectar infecciones de nivel bajo, la presencia de una infección de nivel bajo persistente, detectar infecciones en sujetos con estados de enfermedad infecciosa activa o latente o en sujetos que muestran una inmunodeficiencia o cualquier forma de inmunosupresión. Las características de actuación deseables de un ensayo de respuesta inmunológica mediada por células, en particular para detectar una respuesta de células T específica de antígeno, incluyen una adecuada sensibilidad, especificidad, fiabilidad y reproducibilidad y, además, deben poder realizarse de modo sencillo y rápido.

20 Una forma establecida de un ensayo de diagnóstico de base inmunológica implica la estimulación de células T u otras células del sistema inmunológico con antígenos, seguido de la detección de moléculas efectoras inmunológicas, tales como IFN-gamma u otras citoquinas producidas en respuesta a la estimulación con el antígeno. Las moléculas efectoras inmunológicas se detectan empleando técnicas muy conocidas, tales como inmunoensayos enzimáticos, análisis de esferas múltiplex, ELISA, ELISpot y citometría de flujo. La presencia o el aumento en el nivel de moléculas efectoras inmunológicas también puede determinarse basándose en el nivel de ARN. Estos ensayos son útiles, por ejemplo, para detectar respuestas inmunológicas específicas de enfermedad, en particular respuestas inmunológicas específicas de patógeno. Los respectivos ensayos están disponibles en el mercado con la marca comercial QuantiFERON (marca registrada; Cellestis Limited) y pueden utilizarse, por ejemplo, para diagnosticar una infección por patógenos o para controlar la inmunidad mediada por células contra una enfermedad.

30 Otras aplicaciones de los respectivos ensayos de respuesta inmunológica mediada por células incluyen el análisis o el control de respuestas inmunológicas a vacunas o a inmunoterapia, tal como, por ejemplo, inmunoterapia del cáncer.

35 Existe una gran demanda de estos ensayos con una mayor sensibilidad. Previamente, los métodos para medir las respuestas inmunológicas mediadas por células han sido mejorados incubando la muestra, tal como una muestra de sangre completa, con el antígeno en presencia de un azúcar simple, tal como dextrosa (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/042396 A1). Se ha descubierto que los azúcares simples, tales como dextrosa y glucosa, aumentan la producción de IFN-gamma por las células inmunológicas y, por tanto, aumentan la sensibilidad del ensayo. Se cree que el uso de azúcares simples, tales como la glucosa y la dextrosa, es fundamental para que las células puedan emplear esta fuente de energía y, así, se benefician de la adición del azúcar durante la incubación con el antígeno. Se han observado aumentos significativos en el nivel de IF- γ cuando el azúcar simple se añade directamente a la muestra además del antígeno. Sin embargo, para simplificar la actuación del método resulta preferible proporcionar composiciones de reactivos listas para usar y evitar las etapas de manipulación manual. Por tanto, sería deseable proporcionar una única composición que incluya el antígeno y el azúcar simple. Dicha composición puede proporcionarse en un tubo de recogida de muestras, en el que la muestra está en contacto directo con el antígeno y el azúcar simple en la concentración adecuada, evitando con ello errores de manipulación.

45 En la presente se ha descubierto que la actividad del ensayo disminuye a lo largo del tiempo cuando los respectivos tubos de recogida de muestras que comprenden el antígeno y el azúcar simple se conservan a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas. Esto se ha descubierto con ciertos antígenos. Por tanto, la caducidad de estos componentes del kit es limitada y, después de cierto tiempo de conservación, el ensayo proporciona tan solo una baja sensibilidad o incluso la actividad del ensayo se pierde completamente. Por tanto, los respectivos kits/materiales de ensayo en los que el antígeno se proporciona de modo conveniente junto con un azúcar simple en una composición, no son estables durante la conservación y, por tanto, plantean el riesgo de que la sensibilidad del ensayo se reduzca o incluso se pierda a lo largo del tiempo. Esto no se observa cuando el azúcar simple no se incluye junto con el antígeno en el tubo de recogida de muestras, sino que se añade por separado a la muestra para su incubación con el antígeno.

55 El documento EP 1321670 A1 se refiere a métodos para inducir, mantener y expandir células T citotóxicas que tienen una actividad específica de antígeno mediante el uso, como ingrediente eficaz, de al menos un compuesto seleccionado del grupo que consisten en polisacáridos ácidos, oligosacáridos ácidos, monosacáridos ácidos y sus sales.

Xu Zhi-Jun *et al.* (Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 1993, 117(11):1174-1177) se refiere al campo de los ensayos inmunocitológicos y a la inmunohistoquímica, e indica que puede emplearse una disolución de sacarosa-cloruro de magnesio-glicerol para conservar preparaciones citológicas.

5 Fujita *et al.* (Microbiology and Immunology, 1990, 34(6):523-532) se refiere a la actividad inmunomodificadora *in vivo* de un micoloil glicolípido, éñ 2,3,6'-trimicolato de trehalosa (GaGM) procedente de *R. auranticus*.

Roser (Biopharm., 1991, 4(8):47-53) se refiere a un método denominado "secado de trehalosa" como un nuevo sustituto para las macromoléculas liofilizantes.

10 DATABASE WPI Week 200103 Thompson Scientific, Londres, Reino Unido, AN 2001-016742 y CN 1262131 A (CHANGSHENG IND CO LTD CHANGCHUN CITY) indica que puede emplearse la trehalosa como protector de preparaciones biológicas.

El documento US 4.891.319 A se refiere a la protección de proteínas y otras macromoléculas biológicas con estructuras terciarias frente a la desnaturalización durante el secado en presencia de trehalosa.

El documento WO 98/58259 A1 se dirige a mejorar inmunoensayos que son ensayos inmunoabsorbentes y en los que se capturan anticuerpos, tales como ensayos ELISA.

15 El documento EP 1529536 A1 se refiere a una composición inmunogénica que tiene una mayor capacidad para la inmunoestimulación del sistema inmunológico de un hospedante al cual se administra, y la composición comprende el compuesto isobutirato acetato de sacarosa (SAIB).

El documento WO 00/56365 A1 se refiere a una composición de vacuna líquida que comprende al menos un antígeno que consiste en un polisacárido unido a una proteína portadora y trehalosa.

20 El objeto de la presente invención es superar al menos uno de los inconvenientes de los métodos de la técnica anterior. En particular, el objeto de la presente invención consiste en proporcionar métodos sensibles y fiables para medir la capacidad de respuesta inmunológica mediada por células, así como kits y componentes del kit que tengan buena estabilidad durante la conservación.

Sumario de la invención

25 La invención puede definirse mediante las reivindicaciones adjuntas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para medir la actividad de respuesta inmunológica mediada por células, comprendiendo dicho método:

30 (a) proporcionar una composición de incubación poniendo en contacto una muestra que comprende células inmunológicas capaces de producir moléculas efectoras inmunológicas tras la estimulación con un antígeno de péptido, con al menos un antígeno de péptido que tiene una longitud seleccionada de 5 a 50 aminoácidos, y con al menos un azúcar no reductor capaz de aumentar la respuesta de interferón-gamma de las células inmunológicas que responden al antígeno; y

35 (b) detectar la presencia o el nivel de al menos una molécula efectora inmunológica, en el que la detección de la presencia o del nivel de al menos una molécula efectora inmunológica comprende detectar la presencia o el nivel del interferón-gamma (INF-gamma).

La presente invención también proporciona una composición según la reivindicación 14, un recipiente de recogida de muestras según la reivindicación 16, un kit según la reivindicación 17 y un uso según la reivindicación 19.

40 Los inventores han descubierto que la adición de un azúcar no reductor durante la incubación de la muestra con el antígeno aumenta, de modo sorprendente, los niveles de respuesta y, por tanto, la sensibilidad del método de un modo similar al observado cuando se añade un azúcar simple, tal como dextrosa y glucosa, durante la incubación. Esto resulta inesperado porque previamente se creía que solo puede lograrse un aumento en la sensibilidad con azúcares simples y, por tanto, monosacáridos, que representan azúcares reducidos. Además se ha descubierto, de modo sorprendente, que el método puede mantener su mayor sensibilidad incluso a lo largo de periodos de conservación prolongados de los materiales de ensayo, incluso si el azúcar no reductor y el antígeno se proporcionan en forma de una única composición. Por tanto, los inventores han descubierto, de modo sorprendente, que el uso de un azúcar no reductor, en lugar de un azúcar simple, aumenta significativamente la estabilidad durante la conservación de los componentes del ensayo, al mismo tiempo que aumenta los niveles de respuesta y, por tanto, puede mejorar la sensibilidad del ensayo. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que el azúcar no reductor aumenta la cantidad de moléculas efectoras inmunológicas liberadas en caso de una respuesta 45 inmunológica mediada por células positiva, mejorando con ello la sensibilidad del ensayo. Aparentemente, la producción de moléculas efectoras inmunológicas se potencia. Por tanto, el uso de un azúcar no reductor, según se describe en la presente, también puede permitir la detección más temprana de la estimulación de células inmunológicas que con otras formas posibles. La capacidad para aumentar la sensibilidad de un ensayo de 50 respuesta inmunológica mediada por células también puede permitir el uso de medios menos sensibles de detección

de moléculas efectoras y/o el uso de tamaños de muestra más pequeños. Además, estos efectos beneficiosos también se logran después de una conservación prolongada de los materiales de ensayo, mejorando con ello la fiabilidad y la reproducibilidad del ensayo.

También se describen los siguientes aspectos:

- 5 Según un primer aspecto, se proporciona un método para medir una actividad de respuesta inmunológica mediada por células, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar una composición de incubación poniendo en contacto una muestra que comprende células inmunológicas capaces de producir moléculas efectoras inmunológicas tras la estimulación con un antígeno, con al menos un antígeno y con al menos un azúcar no reductor, y

- 10 (b) detectar la presencia o el nivel de una molécula efectora inmunológica.

Dicho método puede emplearse, por ejemplo, para medir la actividad de respuesta inmunológica mediada por células en un sujeto, tal como un paciente. La presencia (o la ausencia) o el nivel de la molécula efectora inmunológica detectada es indicativo del nivel o la capacidad de un sujeto para montar una respuesta inmunológica mediada por células contra el antígeno ensayado.

- 15 Según un segundo aspecto, se proporciona una composición para inducir una respuesta inmunológica mediada por células, comprendiendo dicha composición:

a) al menos un antígeno;

b) al menos un azúcar no reductor; y

c) opcionalmente al menos un anticoagulante.

- 20 Una respectiva composición puede emplearse de modo conveniente en el método según el primer aspecto de la invención para preparar la composición de incubación poniendo en contacto la muestra que comprende las células inmunológicas con dicha composición.

Según un tercer aspecto, se proporciona un recipiente de recogida de muestras que comprende la composición según el segundo aspecto. El recipiente de recogida de muestras puede utilizarse de modo conveniente en el método según el primer aspecto. Preferiblemente, el recipiente de recogida de muestras es un tubo de recogida de sangre al vacío.

- 25

Según un cuarto aspecto, se proporciona un kit para medir la actividad de respuesta inmunológica mediada por células en un sujeto, que comprende al menos un antígeno, al menos un azúcar no reductor, al menos un recipiente de recogida de muestras que preferiblemente es un tubo de recogida de sangre, y al menos un medio de detección para al menos una molécula efectora inmunológica. Un respectivo kit puede utilizarse para realizar el método según el primer aspecto.

- 30

Según un quinto aspecto, la presente descripción se refiere al uso de un azúcar no reductor en un ensayo inmunológico para medir la actividad de respuesta mediada por células, en el que la adición del azúcar no reductor aumenta la liberación de al menos una molécula efectora inmunológica, preferiblemente IFN-gamma, desde las células inmunológicas que responden al antígeno ensayado en dicho ensayo.

- 35

Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de la figuras

- 40 Figura 1: Efecto de la adición de trehalosa sobre la respuesta de IFN-gamma en un ensayo de QFN-CMV (** p<0,01; *** p<0,001).

Figura 2: Efecto de la adición de trehalosa sobre la respuesta de IFN-gamma en un ensayo de QFN-TB.

Figura 3: Cuatro azúcares no reductores diferentes aumentan el resultado de un QFN-CMV cuantitativo.

Descripción detallada de la invención

La invención puede ser definida por medio de las reivindicaciones adjuntas.

- 45 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto indique lo contrario, el término "comprende" o variaciones tales como "comprendiendo", implican la inclusión de un elemento o número entero o etapa del método o grupo de elementos o de números enteros o de etapas del método mencionados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o etapa del método o de grupos de elementos o de números enteros o de etapas del método.

Tal como se emplea en la presente memoria descriptiva, las formas en singular "un/una" y "el/la" incluyen los aspectos en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula T" incluye una única célula T, así como dos o más células T, y la referencia a "un antígeno" incluye un único antígeno, así como dos o más antígenos. De modo similar, la referencia a un "agente", "reactivo", "molécula" y "compuesto" incluye entidades individuales y combinaciones de dos o más de dichas entidades. La referencia a "la descripción" incluye aspectos individuales o múltiples divulgados por la presente memoria descriptiva, etc.

Según un primer aspecto, se proporciona un método para medir una actividad de respuesta inmunológica mediada por células, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar una composición de incubación poniendo en contacto una muestra que comprende células inmunológicas capaces de producir moléculas efectoras inmunológicas tras la estimulación con un antígeno, con al menos un antígeno y con al menos un azúcar no reductor, y

(b) detectar la presencia o el nivel de una molécula efectora inmunológica.

En la presente se describen realizaciones y aplicaciones ventajosas de dicho método. Según una realización del primer aspecto, se proporciona un método para medir una actividad de respuesta inmunológica mediada por células en un sujeto, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar una composición de incubación poniendo en contacto una muestra que comprende células inmunológicas capaces de producir moléculas efectoras inmunológicas tras la estimulación con un antígeno obtenido de un sujeto, con al menos un antígeno y con al menos un azúcar no reductor, y

(b) detectar la presencia o un aumento en el nivel de una molécula efectora inmunológica.

La presencia (o la ausencia) o un nivel elevado de la molécula efectora inmunológica es indicativo del nivel o la capacidad de respuesta inmunológica mediada por células del sujeto. En particular, dicho método permite determinar si dicho sujeto se ha encontrado previamente con el antígeno o con un antígeno del cual el antígeno ensayado es representativo. Con ello puede determinarse si el sujeto es capaz de suscitar una respuesta inmunológica mediada por células contra dicho antígeno. En ciertas realizaciones, también puede determinarse el nivel cuantitativo de la capacidad de respuesta inmunológica mediada por células. La magnitud de la respuesta inmunológica mediada por células detectada en el ensayo descrito en la presente puede correlacionarse, en ciertas realizaciones, con un estado de enfermedad, con el avance y/o la gravedad de una enfermedad. Por tanto, la presente descripción proporciona un medio para determinar la capacidad de respuesta inmunológica mediada por células en un sujeto. El método descrito permite y/o apoya, entre otros, el diagnóstico de enfermedades, en particular enfermedades infecciosas, condiciones patológicas, permite determinar el nivel de inmunocompetencia y permite la evaluación de la capacidad de respuesta de células inmunológicas a agentes endógenos o exógenos, así como a venenos de proteínas. El ensayo también permite seleccionar o controlar sujetos previamente expuestos a un antígeno concreto, tal como un antígeno asociado con una enfermedad, una infección o un contaminante. Otras aplicaciones y utilidades importantes de dicho método se describirán a continuación.

Las etapas del método individuales y las realizaciones preferidas del método según el primer aspecto de la invención se explicarán a continuación en detalle.

Etapas (a)

En la etapa (a), una muestra que comprende células inmunológicas capaces de producir moléculas efectoras inmunológicas tras la estimulación con un antígeno se pone en contacto con al menos un antígeno y con al menos un azúcar no reductor. Las células inmunológicas y/o la muestra completa pueden obtenerse, por ejemplo, de un sujeto cuya capacidad de respuesta inmunológica mediada por células se va a determinar.

La referencia a un "sujeto" incluye, por ejemplo, un ser humano o una especie no humana, que incluye primates, ganado (por ejemplo, ovejas, vacas, cerdos, caballos, burros, cabras), animales de ensayo de laboratorio (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, cobayas, hámsteres), animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos), especies aviares (por ejemplo, aves de corral, aves de aviario), reptiles y anfibios. El método descrito en la presente puede aplicarse a la investigación, a la medicina humana, así como en aplicaciones para ganado, veterinarias y para la vida salvaje. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano y el método de respuesta inmunológica mediada por células descrito en la presente se emplea para seleccionar la capacidad de respuesta a microorganismos, virus y parásitos patógenos, condiciones de enfermedad, el potencial para el desarrollo o el control de trastornos autoinmunitarios, el control de la respuesta de un sujeto a una exposición oncológica o inmunoterapia, el control de la inmunidad mediada por células contra una enfermedad, y para determinar la presencia de cualquier inmunodeficiencia o inmunosupresión. Esto último puede aparecer, por ejemplo, debido a ciertos medicamentos, que incluyen diversos agentes quimioterapéuticos. Como alternativa, puede determinarse la exposición a venenos proteicos del entorno y contaminantes empleando el método según la presente invención.

La muestra comprende células inmunológicas capaces de producir moléculas efectoras inmunológicas tras la estimulación con un antígeno apropiado. Las "células inmunológicas" incluyen, pero no se limitan a linfocitos, que

5 incluyen células asesinas naturales ("natural killers", NK), células T, células B, macrófagos y monocitos, células dendríticas o cualquier otra célula inmunológica que sea capaz de producir una o más moléculas efectoras inmunológicas en respuesta a una estimulación directa o indirecta con un antígeno. Preferiblemente, la muestra comprende linfocitos, más preferiblemente linfocitos T. Las expresiones "célula T" y "linfocitos T" se emplean en la presente de modo intercambiable. Las células T son capaces de suscitar una fuerte respuesta inmunológica si reconocen al antígeno ofrecido. Si las células T han sido previamente expuestas al antígeno ensayado o a un antígeno del cual el antígeno ensayado es representativo, se produce una rápida reestimulación de las células T con memoria específica de ese antígeno. Estas células T específicas de antígeno responden segregando moléculas efectoras inmunológicas, tales como, en particular, interferón gamma. El interferón gamma, o una molécula efectora inmunológica liberada en respuesta al interferón gamma liberado, puede entonces medirse como marcador específico de la capacidad de respuesta inmunológica contra el antígeno ensayado. Por tanto, según una realización, la muestra comprende linfocitos T, preferiblemente células T auxiliares CD4⁺ y/o células T citotóxicas CD8⁺. Preferiblemente, la muestra también comprende células estimuladoras, en particular células presentadoras de antígenos que son capaces de presentar el antígeno ensayado a las células T. Sin embargo, las células presentadoras de antígenos adecuadas también pueden añadirse por separado a la composición de incubación. Las respectivas células presentadoras de antígenos ("antigen presenting cells", APC) añadidas incluyen células presentadoras de antígenos o partículas naturales y artificiales. Por ejemplo, opcionalmente pueden añadirse por separado células estimuladoras, tales como células presentadoras de antígenos con HLA concordante o autólogas irradiadas, a la composición de incubación, que entonces presenta el antígeno a las células T. Esta realización es posible, por ejemplo, si la muestra no comprende las respectivas células estimuladoras necesarias para inducir una respuesta de células T. Las realizaciones presentadoras de antígenos artificiales incluyen, pero no se limitan a partículas o vesículas de lípidos con péptidos o moléculas de MHC recombinantes y moléculas coestimuladoras recombinantes asociadas.

25 Preferiblemente, la muestra se obtiene de un sujeto. Según una realización, la muestra es un fluido corporal que comprende células inmunológicas o es una célula inmunológica que contiene una porción derivada de un respectivo fluido corporal. Según una realización preferida, la muestra es sangre completa. "Sangre completa" significa sangre procedente de un sujeto que no ha sido sustancialmente diluida o fraccionada. Según una realización, la muestra de sangre completa es sangre periférica. A pesar de que la sangre completa es la muestra preferida y más conveniente para determinar la actividad de respuesta inmunológica mediada por células, también pueden emplearse otras muestras que contengan células inmunológicas. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a fluido linfático, fluido cerebral, fluido de tejidos (tales como médula ósea o fluido del timo) y fluido respiratorio, que incluye fluido nasal y pulmonar y lavado bronquioalveolar. También pueden emplearse como muestra porciones o derivados de las muestras mencionadas anteriormente, por ejemplo, muestras mermadas en células innecesarias para medir la respuesta inmunológica mediada por células, y esto puede obtenerse mediante el procesamiento de la muestra. Por ejemplo, puede tratarse sangre completa para eliminar los componentes innecesarios para la respuesta de CMI, tales como eritrocitos y/o plaquetas, mediante métodos conocidos en la técnica, o puede procesarse para enriquecerla en leucocitos. También pueden obtenerse células de la capa leucocítica o células mononucleares de sangre periférica ("peripheral blood mononuclear cells", PBMC) mediante métodos conocidos en la técnica y estas pueden emplearse como muestra. Según una realización, se emplean células inmunológicas cultivadas como muestra. Además, también pueden usarse células criopreservadas, por ejemplo, células PBMC criopreservadas, como fuente de células inmunológicas del sujeto y, por tanto, como muestra. Por ejemplo, células PBMC descongeladas pueden ponerse en contacto con un medio de cultivo para proporcionar la muestra que comprende células inmunológicas, que después se pone en contacto y se incuba con un antígeno y el azúcar no reductor, que preferiblemente se añaden en forma de una única composición. Según una realización, la muestra comprende todas las células inmunológicas necesarias para mediar en una respuesta inmunológica celular. Sin embargo, tal como se describió anteriormente, dentro del alcance de la presente invención también se pueden añadir por separado células estimuladoras, en particular células presentadoras de antígenos. Según una realización, la muestra comprende al menos células T (linfocitos T) y células NK (linfocitos NK). Según una realización, la muestra no se diluye en más del 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o 3% antes de poner en contacto la muestra con el antígeno y/o el azúcar no reductor.

La muestra que se va a analizar se pone en contacto con al menos un antígeno y con al menos un azúcar no reductor para proporcionar una composición de incubación.

El término "antígeno", tal como se emplea en la presente, se refiere, en particular, a cualquier molécula o agente que es capaz de estimular o reestimar una respuesta inmunológica y, en particular, que es capaz de estimular o reestimar una respuesta inmunológica celular. Por tanto, el término "antígeno" se emplea en un sentido amplio. El término se refiere, en particular, a cualquier molécula o agente que puede unirse a un complejo de histocompatibilidad mayor ("major histocompatibility complex", MHC) y que puede ser presentada a un receptor de células T o puede ser unida por un anticuerpo. El término también puede referirse a cualquier molécula o agente que puede unirse a proteínas de MHC no clásicas, tales como, por ejemplo, CD1d u otros miembros de la familia de CD1. Según una realización, el antígeno es un inmunógeno. Según una realización, el antígeno no es un inmunógeno. Los antígenos incluyen, pero no se limitan a péptidos, proteínas, haptenos, alérgenos o toxinas, o a cualquier molécula natural o sintética o a una de sus partes. Según una realización, el antígeno es un patógeno inactivo o una de sus porciones o sus lisados. Según una realización, el antígeno se selecciona del grupo que

consiste en péptidos, proteínas, que incluyen glicoproteínas, carbohidratos, fosfolípidos, fosfoproteínas, fosfolipoproteínas y sus fragmentos. El término "péptido", tal como se emplea en la presente, también incluye polipéptidos y proteínas, a menos que el contexto indique lo contrario. El término "proteína" también incluye las formas modificadas, tales como glicoproteínas y fosfoproteínas. Según una realización, el antígeno comprende uno o más péptidos de longitud completa o de longitud parcial. Según una realización, el antígeno es proporcionado por un péptido. Según una realización, dichos uno o más péptidos empleados como antígeno tienen una longitud seleccionada de 5 a 100 aminoácidos, preferiblemente de 7 a 50 aminoácidos. Según una realización, el antígeno es proporcionado por un conjunto de péptidos de uno o más péptidos diferentes de longitud completa o de longitud parcial. Un conjunto de péptidos comprende al menos dos péptidos e incluye, en una realización, una serie de péptidos solapantes o no solapantes. Un respectivo conjunto de péptidos puede cubrir la longitud completa o una parte del antígeno de proteína natural. Sin embargo, no es necesario que los péptidos sean solapantes o pueden solaparse en un único aminoácido o en múltiples aminoácidos. Según una realización, se emplea un conjunto de péptidos que incluyen de 80-100% de un antígeno de proteína o péptido natural.

Según una realización, el antígeno es proporcionado por al menos un péptido que es reconocido por una célula T citotóxica CD8⁺. Para esta realización, el antígeno preferiblemente es proporcionado por al menos un péptido que tiene una longitud menor que 5 aminoácidos, preferiblemente 13 aminoácidos o menos, 12 aminoácidos o menos, 11 aminoácidos o menos, o 10 aminoácidos o menos. Los intervalos de tamaño adecuados para el respectivo péptido que es reconocido por una célula T citotóxica CD8⁺ incluyen 7-14 restos aminoácidos, 7-13 restos aminoácidos, de 8 a 12 restos aminoácidos, 8-11 restos aminoácidos, y de 8 a 10 restos aminoácidos. También puede emplearse un conjunto de péptidos que comprende o consiste en péptidos que son reconocidos por células T citotóxicas CD8⁺. Dichos péptidos pueden incluir todo o parte de un antígeno de proteína, tal como un antígeno de proteína natural. Se ha descubierto que los ensayos que incorporan los respectivos péptidos cortos como antígenos muestran una disminución significativa en la actividad de ensayo durante la conservación en presencia de azúcares simples, tales como glucosa o dextrosa. Esto no se observa cuando se utilizan azúcares no reductores, tal como divulga la presente invención. En la presente, la sensibilidad del ensayo sigue siendo alta debido a la incorporación del azúcar no reductor, incluso después de un tiempo de conservación prolongado de los componentes del ensayo. Esta es una ventaja importante cuando se emplea una composición que comprende un antígeno de péptido que es reconocido por una célula T citotóxica CD8⁺ y un azúcar no reductor, por ejemplo, como compuesto del kit, respectivamente componente.

Según una realización, el antígeno es proporcionado por al menos dos conjuntos de péptidos, comprendiendo el primer conjunto al menos un péptido con una longitud de aproximadamente 7 a 14 aminoácidos, y un segundo conjunto que comprende al menos un péptido de 15 restos aminoácidos o más, en el que dichos péptidos incluyen todo o parte de un antígeno de proteína. Cada conjunto respectivo comprende desde al menos un péptido a una serie de péptidos solapantes o no solapantes. La coincubación con los péptidos de 7 a 14 aminoácidos y los péptidos de ≥ 15 aminoácidos derivados o correspondientes a un antígeno de proteína representativo de la enfermedad o el trastorno que se va a ensayar con las células inmunológicas comprendidas en la muestra produce un ensayo más sensible, permitiendo con ello la detección más temprana de la estimulación de células inmunológicas y, en particular, de linfocitos, que con otras formas posibles. La capacidad para aumentar la sensibilidad de un ensayo de respuesta inmunológica mediada por células reduce de modo ventajoso el límite de detección y/o permite el uso de medios menos sensibles para detectar moléculas efectoras. Por tanto, la utilización de al menos dos conjuntos de los respectivos péptidos en combinación con un azúcar no reductor resulta beneficiosa. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría o por un modo de acción, se cree que los dos conjuntos de péptidos, los péptidos 7 a 14-meros y los péptidos ≥ 15 -meros, permite la detección por células T CD4⁺ y CD8⁺. Las células T CD4⁺ reconocen a los péptidos >15 -meros y las células T CD8⁺ reconocen los péptidos 7 a 14-meros. Estos péptidos pueden mencionarse en la presente como "péptidos CD4⁺" (péptidos ≥ 15 -meros) o "péptidos CD8⁺" (péptidos 7 a 14-meros). Cada conjunto comprende al menos un péptido e incluye, en una realización, una serie de péptidos solapantes. Por tanto, un primer conjunto puede contener una serie de péptidos solapantes con una longitud de 7 a 14 restos aminoácidos. Estos péptidos son reconocidos por células T CD8⁺ (péptidos CD8⁺). Un segundo conjunto puede contener una serie de péptidos solapantes con una longitud de más de 15 restos aminoácidos. Estos péptidos son reconocidos por células T CD4⁺ citotóxicas (péptidos CD4⁺). Ambos conjuntos de péptidos pueden cubrir la longitud completa o una parte de un antígeno de proteína, por ejemplo, un antígeno de proteína natural representativo de la enfermedad o el trastorno que se está ensayando. No es necesario que los péptidos sean solapantes o pueden solaparse en un único aminoácido o en múltiples aminoácidos. Los péptidos incluyen conjuntos de péptidos que incluyen y, por tanto, cubren del 80-100% de un antígeno de proteína. Del "80-100%" significa 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%. La referencia a una serie de péptidos solapantes con una longitud de aproximadamente 7 a 14 restos aminoácidos que incluyen todo o parte de un antígeno de proteína según una realización significa un péptido con una longitud de aproximadamente 7 restos aminoácidos hasta un máximo de 14 restos aminoácidos que, en total, abarcan desde cada resto aminoácido que, en total, incluyen todos restos aminoácidos hasta 6 restos aminoácidos de un antígeno de proteína desde su extremo N-terminal a su extremo C-terminal o una de sus partes. Por tanto, si la longitud de un péptido concreto es de x aminoácidos, en el que x es de aproximadamente 7 a 14, entonces 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 de x-1. Una serie de péptidos solapantes de ≥ 15 restos aminoácidos de longitud también abarcan todo o parte de un antígeno de proteína, en el que cada péptido tiene una longitud de al menos 15

aminoácidos o hasta la longitud del antígeno de proteína completo. En una realización, un péptido de ≥ 15 restos aminoácidos de longitud tiene de 15 a 50 aminoácidos, tal como as 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 restos aminoácidos.

5 La presente descripción incluye el caso en que cada péptido en la serie o el conjunto de péptidos tienen la misma longitud (es decir, x). Sin embargo, la serie de péptidos o el conjunto de péptidos puede comprender una mezcla de $x_1, x_2, x_j \dots x_i$ péptidos en los que, según una realización, cada uno de los péptidos x_i tiene una longitud de aproximadamente 7 a 14 restos aminoácidos o una longitud de ≥ 15 restos aminoácidos. Los péptidos CD4⁺ y/o CD8⁺ pueden dividirse en distintas agrupaciones de péptidos. Pueden añadirse por separado a la muestra o pueden incluirse en una composición, preferiblemente junto con el azúcar no reductor. Esta composición entonces puede
10 ponerse en contacto con la muestra para preparar la composición de incubación.

En algunas realizaciones, se emplean uno o más antígenos que imitan uno o más de los efectos de los antígenos presentados al sistema inmunológico *in vivo*. Según una realización, el antígeno se selecciona de un autoantígeno, un antígeno derivado de un antígeno o que presenta reactividad cruzada con un antígeno procedente de un organismo patógeno, una molécula de metal o inorgánica que estimula una respuesta inmunológica o un antígeno asociado a tumor. Según una realización, el antígeno se deriva de un antígeno y, por tanto, presenta reactividad cruzada con él, derivado de un patógeno asociado con un trastorno de enfermedad, o es un antígeno asociado a tumor asociado con un cáncer, o es o se deriva de un veneno. Según una realización, la muestra se pone en contacto con un antígeno que es específico para la enfermedad o el trastorno para el cual se va a ensayar la respuesta inmunológica mediada por células, por ejemplo, un antígeno asociado o que es representativo de una enfermedad o trastorno que se va a ensayar. Según una realización, el antígeno es un antígeno específico de enfermedad, en particular un antígeno específico de patógeno. En algunas realizaciones, el patógeno es una bacteria, un virus, un parásito o un hongo. En una realización ilustrativa, el antígeno es un antígeno de una micobacteria, en particular *Mycobacterium tuberculosis*. Por tanto, en algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno específico de la tuberculosis (TB). Por ejemplo, el antígeno puede ser una derivado de proteína purificado a partir de *Mycobacterium tuberculosis* o *M. avium*. En algunas realizaciones, el antígeno imita a proteínas micobacterianas, tales como ESAT-6, CFP-10 y TB7, respectivamente TB7.7. En otra realización ilustrativa, el antígeno procede o es específico de un virus, tal como citomegalovirus (CMV).
15
20
25

Otros ejemplos de antígenos, en particular antígenos específicos de enfermedad, también se describen a continuación.

30 Además, la muestra se pone en contacto en la etapa a) con un azúcar no reductor. Un "azúcar no reductor" se refiere, en particular, a un azúcar que no reacciona con un reactivo de detección para azúcares reductores, tales como disolución de Fehling, reactivo de Benedict o reactivo de Tollens. Un azúcar no reductor no comprende un extremo reductor libre y, en consecuencia, no comprende un grupo aldehído libre o cetona libre. El azúcar no reductor puede tener cualquier longitud y puede ser lineal o ramificado. En ciertas realizaciones, el azúcar no reductor comprende al menos dos unidades de monosacárido. Según una realización, en cualquiera y todas las unidades de monosacárido del azúcar no reductor, los átomos de carbono junto al átomo de oxígeno en la estructura del anillo no comprenden un grupo hidroxilo y, por tanto, no comprende un grupo hidroxilo anomérico. Según una realización, las estructuras de anillo de las unidades de monosacárido del oligosacárido no reductor no comprenden un grupo hemiacetal o hemicetal. Según una realización, el azúcar no reductor es un oligosacárido que comprende
35 10 unidades de monosacárido o menos, más preferiblemente 8 unidades de monosacárido o menos, 6 unidades de monosacárido o menos, 5 unidades de monosacárido o menos, 4 unidades de monosacárido o menos, 3 unidades de monosacárido o menos, o 2 unidades de monosacárido. Preferiblemente, el azúcar no reductor es un disacárido. Según una realización, los enlaces glicosídicos se forman entre las unidades de monosacárido uniendo el extremo reductor de una unidad de monosacárido con el extremo reductor de otra unidad de monosacárido. Los ejemplos preferidos del azúcar no reductor son sacarosa y trehalosa. Además, tal como se muestra en los ejemplos, también puede emplearse el manitol y la rafinosa como azúcar no reductor. Así, según una realización, el azúcar no reductor se selecciona de trehalosa, manitol, sacarosa y rafinosa. Tal como se demuestra en los ejemplos, estos ejemplos de azúcares no reductores aumentan la magnitud de la respuesta. La trehalosa es particularmente preferida porque los experimentos han demostrado que la trehalosa aumenta la magnitud de la respuesta y, por tanto, puede aumentar la sensibilidad del ensayo y, además, una composición que comprende trehalosa y un antígeno muestra una excelente estabilidad durante la conservación. Tal como se demuestra en los ejemplos, entre los azúcares no reductores ensayados, la respuesta de aumento del efecto más potente se obtuvo con la trehalosa. Sin embargo, el azúcar no reductor también puede ser un monosacárido en el que, por ejemplo, el extremo reductor está acoplado a otra entidad química y, por tanto, bloqueado. Por consiguiente, el azúcar no reductor puede derivatizarse. Los ejemplos de derivados de azúcares son los aminoazúcares, en los que uno o más grupos hidroxilo están sustituido por un grupo amino o un grupo acetilamino. En realizaciones preferidas, el azúcar no reductor no está sustituido y, en particular, no está derivatizado. Según una realización, el azúcar no reductor no es un polisacárido. En ciertas realizaciones, el azúcar no reductor no está unido a una proteína, un péptido o un lípido u otra macromolécula. Según una realización, el azúcar no reductor no está comprendido en un medio de cultivo celular u otro medio.
40
45
50
55
60 Según una realización, el azúcar no reductor no está comprendido en un líquido. El azúcar no reductor puede ser metabolizado por las células inmunológicas comprendidas en la muestra. Según una realización, el azúcar no reductor es un azúcar no reductor que, cuando está presente en una concentración apropiada en la composición de incubación que comprende la muestra y el antígeno, es capaz de aumentar la liberación del interferón gamma por

las células T reestimuladas.

Poniendo en contacto la muestra con el antígeno, el azúcar no reductor y, opcionalmente, otros aditivos se proporciona una composición de incubación. Preferiblemente, dicha composición de incubación se incuba por encima de la temperatura ambiente y, por tanto, a temperaturas elevadas. Preferiblemente, la temperatura de incubación es mayor que 30 °C, preferiblemente mayor que 35 °C. Los intervalos adecuados para la temperatura de incubación incluyen de 30 °C a 40 °C, preferiblemente de 35 °C a 40 °C. De modo conveniente, la composición de incubación se incuba a 37 °C +/- 1 °C. Preferiblemente, la composición de incubación se incuba durante al menos 2 horas a dichas temperaturas elevadas para permitir la estimulación de las células inmunológicas por el antígeno y la producción de moléculas efectoras inmunológicas. La etapa de incubación puede durar de 2 a 50 horas, tal como de 2 a 40 horas, de 5 a 30 horas, de 8 a 24 horas, de 16 a 24 horas, o un periodo de tiempo intermedio entre estos, que incluye 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. En algunas realizaciones, después de una etapa de mezclado inicial opcional para distribuir el antígeno o los antígenos, el azúcar no reductor y la muestra a través de la composición de incubación, se realiza la incubación sin volver a mezclar.

En la composición de incubación, el azúcar no reductor está presente en una concentración en la que es eficaz para potenciar la estimulación, respectivamente la reestimulación de las células del sistema inmunológico por el antígeno. Por tanto, el azúcar no reductor se añade a una concentración en la que, en una muestra positiva, es decir, en una muestra que inmunorresponde al antígeno, la adición del azúcar no reductor a la composición de incubación aumenta el nivel de moléculas efectoras inmunológicas producidas, preferiblemente interferón gamma, comparado con el caso en que no se añade el azúcar no reductor. Así, el azúcar no reductor se añade a una concentración en la que potencia la magnitud de respuesta de moléculas efectoras inmunológicas, puesto que se producen más moléculas efectoras inmunológicas en una muestra que muestra una respuesta inmunológica mediada por células. Preferiblemente, el azúcar no reductor se emplea a una concentración en la que potencia la respuesta de moléculas efectoras inmunológicas en al menos 1,1 veces, preferiblemente en al menos 1,2 veces, más preferiblemente en al menos 1,3 veces. Según una realización, el azúcar no reductor mantiene la capacidad de las células inmunológicas comprendidas en la muestra para mediar en una respectiva respuesta a lo largo de periodos de tiempo prolongados. Según una realización, la concentración del azúcar no reductor en la composición de incubación es de al menos 1 mg/ml, al menos 1,5 mg/ml, preferiblemente al menos 1,75 mg/ml, más preferiblemente al menos 2 mg/ml. Los ejemplos de intervalos incluyen, pero no se limitan a de 1 mg/ml a 20 mg/ml, de 1,5 mg/ml a 17,5 mg/ml, de 2 mg/ml a 15 mg/ml, de 3 mg/ml a 15 mg/ml, de 4 mg/ml a 12,5 mg/ml, y de 5 mg/ml a 10 mg/ml. Tal como muestran los ejemplos, estos intervalos son adecuados, por ejemplo, para la trehalosa. También son adecuados para otros azúcares no reductores, tales como sacarosa, manitol y rafinosa, según se demuestra en los ejemplos. Según una realización, la concentración del azúcar no reductor en la composición de incubación se encuentra en un intervalo de 1,5 mg/ml a 10 mg/ml, por ejemplo, de 1,75 mg/ml a 7,5 mg/ml, o de 2 mg/ml a 5 mg/ml. Los expertos en la técnica también pueden determinar las concentraciones adecuadas siguiendo las indicaciones descritas en la presente.

Pueden añadirse uno o más aditivos adicionales y, por tanto, se incluyen en la composición de incubación. Por ejemplo, pueden añadirse uno o más aditivos que son necesarios o ventajosos para la preparación de la muestra y/o la conservación de muestra, tales como, por ejemplo, un anticoagulante adecuado si la muestra es una muestra de sangre. Preferiblemente, el anticoagulante es heparina. Los aditivos no deben estar a una concentración en la cual puedan interferir con la respuesta inmunológica mediada por células. Según una realización, no se añade un azúcar simple a la composición de incubación además del azúcar no reductor. Según una realización, no se añade un azúcar reductor, en particular un monosacárido reductor, a la composición de incubación además del azúcar no reductor.

Según una realización, la muestra se pone en contacto con una composición que comprende el antígeno y el azúcar no reductor. Esta realización resulta particularmente ventajosa porque el usuario no tiene que añadir el azúcar no reductor por separado a la composición de incubación. Proporcionar estas composiciones listas para usar evita errores de manipulación y ahorra personal. Opcionalmente, un diluyente o un disolvente está comprendido en la composición que comprende el antígeno y el azúcar no reductor. Además, pueden incluirse uno o más aditivos en dicha composición si van a ser incluidos en la composición de incubación. Los aditivos no deben interferir en la respuesta mediada por células. Según una realización, la composición comprende además un anticoagulante, preferiblemente heparina. Según una realización, la composición no comprende un azúcar simple. Según una realización, la composición no comprende un azúcar reductor, en particular no comprende un monosacárido reductor.

Para preparar la composición de incubación, la composición que comprende el antígeno, el azúcar no reductor y, opcionalmente, uno o más aditivos adicionales, tales como un anticoagulante en el caso de una muestra de sangre, se pone en contacto con la muestra. La muestra puede añadirse a la composición o viceversa. Para preparar la composición de incubación, la muestra, el antígeno, el azúcar no reductor y el aditivo adicional (si está presente) preferiblemente se mezclan.

Los ejemplos de formas de composición adecuadas incluyen composiciones líquidas, composiciones semilíquidas, composiciones de tipo gel y composiciones sólidas, en particular composiciones secadas. Según una realización, la composición que comprende el antígeno, el azúcar no reductor y, opcionalmente, un aditivo adicional, está

comprendida en un recipiente de recogida de muestras, preferiblemente un tubo de recogida de muestras, tal como un tubo de recogida de sangre. Esto resulta particularmente conveniente puesto que la muestra se pone directamente en contacto con la composición tras su recogida. Según una realización, la composición que comprende el antígeno, el azúcar no reductor y, opcionalmente, un aditivo adicional, se seca por pulverización hacia el interior del recipiente de recogida de muestras. Los métodos de secado por pulverización son muy conocidos en la técnica anterior y, por tanto, no es necesaria una descripción detallada en la presente.

Según una realización, la muestra se obtiene de un sujeto y no se diluye, tal como, por ejemplo, con cultivos de tejidos, medios, excipientes u otros agentes líquidos antes de ponerla en contacto con el azúcar no reductor y/o el antígeno. Según una realización, la composición de incubación comprende al menos 10% en volumen de la muestra. La expresión "al menos 10% en volumen" incluye volúmenes de muestra de 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 la composición de incubación.

Tal como se muestra en los ejemplos, la adición de un azúcar no reductor en la etapa a) aumenta de forma sorprendente la liberación de moléculas efectoras inmunológicas, tales como, en particular, interferón gamma, aumentando con ello la sensibilidad del ensayo. Este efecto es muy sorprendente, ya que se creía que este efecto solo puede lograrse con azúcares simples y, por tanto, monosacáridos reductores. Además, se ha descubierto que las composiciones que comprenden el antígeno y un azúcar no reductor muestran una mejor estabilidad durante la conservación incluso a temperaturas elevadas. El efecto observado con azúcares reductores que consiste en que la sensibilidad y la calidad del ensayo pueden disminuir a lo largo del tiempo no se observa con los azúcares no reductores. Por tanto, la presente invención realiza una importante contribución a la técnica anterior proporcionando un ensayo sensible y estable durante la conservación que también mantiene la actuación del ensayo a lo largo de periodos de conservación prolongados. Las indicaciones de la presente invención permiten, de modo conveniente, proporcionar el antígeno y el azúcar no reductor en forma de una composición estable durante la conservación. En la presente invención, el azúcar no reductor no se emplea como estabilizante para el antígeno. Mediante experimentos, se ha demostrado que los antígenos, en particular antígenos de péptidos, son muy estables durante la conservación. Por tanto, no se observa disminución en la actuación del ensayo si el antígeno se conserva en ausencia de un azúcar. Por tanto, el azúcar no reductor se emplea para potenciar la sensibilidad del ensayo, en particular mediante la potenciación de la producción y/o la liberación de moléculas efectoras inmunológicas, en particular de citoquinas, tales como interferón gamma.

Etapa (b)

En la etapa (b) se detecta la presencia o un aumento en el nivel de una molécula efectora inmunológica. Tal como se describió anteriormente, la presencia (que incluye la ausencia) o el nivel de una molécula efectora inmunológica es indicativo del nivel o la capacidad de respuesta inmunológica mediada por células del sujeto frente al antígeno ensayado. En particular, dicho método permite determinar si dicho sujeto se ha encontrado previamente con el antígeno ensayado o con un antígeno que muestra reactividad cruzada con el antígeno ensayado, tal como el patógeno que se va a detectar. Con ello puede determinarse si el sujeto es capaz de suscitar una respuesta inmunológica mediada por células contra dicho antígeno, respectivamente el antígeno, patógeno o enfermedad para los cuales el antígeno ensayado es representativo.

La detección de la molécula efectora inmunológica puede producirse al nivel de péptido o de proteína o al nivel de ácido nucleico, en particular, al nivel de la expresión del ARNm de la molécula efectora inmunológica. En consecuencia, la referencia a detectar "la presencia o el nivel" de la molécula efectora inmunológica incluye datos directos e indirectos. Por ejemplo, la presencia o la cantidad de moléculas efectoras inmunológicas puede determinarse directamente empleando métodos de detección apropiados, tales como ELISA o ELISpot. Sin embargo, en una realización, la presencia o el nivel de la molécula efectora inmunológica se mide basándose en el nivel de expresión de su ARN. Unos niveles elevados del ARNm de la molécula efectora inmunológica son datos indirectos que muestran un aumento en los niveles de la molécula efectora inmunológica. Los métodos adecuados para determinar el nivel de expresión de un ARNm de un gen diana son muy conocidos en la técnica anterior y, por tanto, no es necesaria una descripción detallada. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la molécula efectora inmunológica puede detectarse empleando ligandos o moléculas de unión, tales como anticuerpos específicos para la molécula efectora, o midiendo el nivel de expresión de genes que codifican la molécula efectora inmunológica.

Las moléculas efectoras inmunológicas que se van a detectar pueden ser cualquiera de una gama de moléculas que se producen en respuesta a la activación, la estimulación o la reestimulación de células por un antígeno. Además, en la etapa (b) puede detectarse más de una molécula efectora inmunológica o un patrón de moléculas efectoras inmunológicas liberadas tras el contacto de la muestra con el antígeno ensayado. La molécula efectora inmunológica que se va a medir puede ser producida por células inmunológicas, en particular puede ser producida por linfocitos, tales como células T, en particular células T auxiliares CD4⁺ y/o células T citotóxicas CD8⁺. Así, en algunas realizaciones, el método se basa en medir la producción de una o más moléculas efectoras inmunológicas por las células del sistema inmunológico, en particular células T, en respuesta a una estimulación antigénica. Sin embargo, también las células no inmunológicas pueden liberar moléculas efectoras inmunológicas en respuesta a una

estimulación, respectivamente una reestimulación, de las células inmunológicas por el antígeno, puesto que son estimuladas por las moléculas efectoras inmunológicas que son liberadas por las células inmunológicas, en particular por moléculas efectoras inmunológicas, tales como IFN-gamma, liberadas por las células T reestimuladas. Estas moléculas efectoras inmunológicas también pueden ser una importante fuente de información. Por tanto, según una realización, la molécula efectora inmunológica que se va a detectar puede ser la molécula efectora inmediata producida por las células T efectoras en respuesta a la reestimulación con un antígeno. En otras realizaciones, se mide una molécula efectora inmunológica corriente abajo. Por ejemplo, el IFN-gamma u otras moléculas efectoras inmunológicas inmediatas producidas por las células inmunológicas, en particular por células T que son (re)estimuladas por el antígeno ensayado, puede medirse en la etapa (b). Sin embargo, tal como se describió anteriormente, a menudo estas moléculas inducen o potencian la producción de otras moléculas efectoras inmunológicas por otras células. La producción de estas otras moléculas efectoras inmunológicas (corriente abajo) también puede ser medida en la etapa (b). La presente invención también incluye detectar más de un tipo de molécula efectora inmunológica en la etapa (b). Según una realización, la presencia o el nivel de un patrón de moléculas efectoras inmunológicas se detecta en la etapa (b), tanto de modo individual como además de las moléculas efectoras inmunológicas inmediatas, tales como IFN-gamma. Un respectivo patrón comprende más de dos, preferiblemente más de tres moléculas efectoras inmunológicas diferentes. El análisis de un respectivo patrón puede proporcionar información valiosa del estado inmunológico del sujeto. Por ejemplo, moléculas efectoras inmunológicas específicas o patrones de moléculas efectoras inmunológicas específicos pueden ser característicos de enfermedades específicas.

Según una realización, la molécula efectora inmunológica que se va a medir en la etapa (b) es una citoquina, tal como una linfoquina, una interleuquina o una quimioquina. Un interferón (IFN), tal como IFN-gamma, es particularmente útil como molécula efectora inmunológica para ser determinada. Otros ejemplos de moléculas efectoras inmunológicas incluyen, pero no se limitan a una gama de citoquinas, tales como interleuquinas (IL), por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 (CXCL8), IL-10, IL-12, IL-13, IL-16 (LCF) o IL-17, IL-1a (IL-1 F1), IL-1 β (IL-1F2), IL-1ra (IL-1F3), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor estimulante de colonias (CSF), tal como CSF de granulocitos ((G)-CSF) o CSF de macrófagos granulocitos ((GM)-CSF), componente 5a del complemento (C5a), Gro α (CXCL1), sICAM-1 (CD54), IP-10 (CXCL10), I-TAC (CXCL11), MCP-1 (CCL2), MIF (GIF), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), serpina E1 (PAI-1), RANTES (CCL5) o MIG (CXCL9). En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos en los que la molécula efectora inmunológica que se va a detectar en la etapa (b) es una citoquina, un componente del sistema del complemento, perforina, defensina, catelicidina, granzima, ligando de Fas, ligando de CD-40, exotaxina, una citotoxina, una quimioquina o una monoquina. En realizaciones preferidas, la molécula efectora inmunológica detectada en la etapa (b) es IFN-gamma. Así, según una realización preferida, la presente descripción proporciona un método para medir una respuesta inmunológica mediada por células en un sujeto, comprendiendo dicho método recoger una muestra de dicho sujeto hacia un recipiente de recogida, en el que dicha muestra comprende células del sistema inmunológico que son capaces de producir IFN-gamma tras ser estimuladas con un antígeno, incubar dicha muestra con un antígeno y un azúcar no reductor, y después medir la presencia o una elevación en el nivel de una IFN-gamma, en el que la presencia o el nivel de IFN-gamma es indicativo de la capacidad de dicho sujeto para montar una respuesta inmunológica mediada por células.

Además, en la etapa (b) puede detectarse una combinación de moléculas efectoras inmunológicas. Así, la etapa (b) comprende, en particular, detectar una molécula efectora inmunológica o una combinación de moléculas efectoras inmunológicas, en particular citoquinas, liberadas en respuesta a la estimulación con el antígeno y que son características de la enfermedad o el trastorno que se va a analizar. Además, el nivel de dichas una o más moléculas efectoras inmunológicas puede seleccionarse de modo individual o en combinación con otros biomarcadores o indicadores de enfermedad.

Según una realización, la molécula efectora inmunológica se detecta empleando un ligando que se une específicamente con la molécula efectora inmunológica. Los ligandos de los efectores inmunológicos son particularmente útiles para detectar y/o cuantificar estas moléculas. Las células comprendidas en la composición de incubación pueden retirarse antes de detectar la molécula efectora inmunológica. Las técnicas para los ensayos de detección que pueden utilizarse en la etapa (b) son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, radioinmunoensayos, ensayos de "sandwich", ELISA y ELISpot. Los anticuerpos contra los efectores inmunológicos son particularmente útiles como ligandos. La referencia a "anticuerpos" incluye partes de anticuerpos que se unen específicamente a la molécula efectora inmunológica, tales como fragmentos Fab, anticuerpo mamíferalizados (por ejemplo, humanizados), anticuerpos desinmunizados, anticuerpos recombinantes o sintéticos, y anticuerpos híbridos y monocatenarios. Pueden obtenerse anticuerpos policlonales y monoclonales mediante inmunización con las moléculas efectoras inmunológicas o con sus fragmentos antigénicos, y cualquiera de estos dos tipos puede utilizarse en inmunoensayos. Los métodos para obtener ambos tipos de anticuerpos son muy conocidos en la técnica. Los anticuerpos policlonales son menos preferidos, pero se preparan con relativa facilidad inyectando a un animal de laboratorio adecuado una cantidad eficaz del efector inmunológico, o una de sus partes antigénicas, recogiendo suero del animal y aislando el suero específico mediante cualquiera de las técnicas inmunoabsorbentes conocidas. Aunque los anticuerpos producidos mediante este método pueden utilizarse en casi cualquier tipo de inmunoensayo, en general son menos apreciados debido a la heterogeneidad potencial del producto. El uso de anticuerpos monoclonales en un inmunoensayo es particularmente 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 por medio de fusionar una línea de células inmortales y linfocitos sensibilizados contra la preparación inmunogénica puede realizarse mediante técnicas muy conocidas por los expertos en la técnica. También están disponibles en el mercado anticuerpos contra moléculas efectoras inmunológicas específicas.

Según una realización, la etapa (b) comprende poner en contacto la composición de incubación, o una de sus porciones, tal como, por ejemplo, una porción mermada en células de ella, con un anticuerpo, o uno de sus fragmentos, específico para la molécula efectora inmunológica que se va a detectar, durante un tiempo y bajo unas condiciones suficientes para que se forme un complejo de anticuerpo-efector, y después detectar dicho complejo.

Tal como se describió anteriormente, las células comprendidas en la composición de incubación pueden retirarse, por ejemplo, mediante centrifugación, antes de la detección. Por ejemplo, cuando se emplea sangre como muestra, las células pueden separarse de la composición de incubación después de la incubación y, por tanto, la producción y la liberación de moléculas efectoras inmunológicas se realizan antes de la detección, con lo que básicamente se proporciona una muestra de plasma.

Están disponibles una amplia gama de técnicas de inmunoensayo, tal como puede observarse remitiéndose a las patentes de EEUU n.ºs 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. Los respectivos ensayos que pueden emplearse junto con los ensayos de respuesta inmunológica mediada por células descritos en la presente para detectar las moléculas efectoras inmunológicas producidas también se describen en los documentos WO2004/042396, WO2008/113119, WO2010/009494 y WO2011/075773. También en Clay *et al.*, Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer, *Clinical Cancer Research*, 2001, 7:1127-1, 135, se describen varios métodos para controlar las respuestas inmunológicas celulares, por lo que también se describen ensayos adecuados para detectar las moléculas efectoras inmunológicas producidas en respuesta a la (re)estimulación con un antígeno. En este artículo se describen, por ejemplo, ensayos basados en ELISA, ensayos ELISpot y ensayos basados en ácidos nucleicos, tales como la medición de los niveles de ARNm de citoquinas mediante RT-PCR cuantitativo a tiempo real. Opcionalmente, cuando se determina el nivel de una molécula efectora inmunológica basándose en el nivel de expresión de su ARN, los datos obtenidos pueden normalizarse a la expresión de un gen control, tal como, por ejemplo, CD8. Los respectivos métodos también pueden utilizarse junto con la presente invención para detectar las moléculas efectoras inmunológicas producidas. Según una realización, se emplea un ensayo basado en ácidos nucleicos para detectar la presencia o el nivel de una molécula efectora inmunológica. Los ácidos nucleicos, en particular el ARN, pueden aislarse de la composición de incubación, o de su porción celular, empleando métodos convencionales muy conocidos en la técnica anterior. Preferiblemente, la presencia o el aumento de la expresión de la molécula efectora inmunológica se detecta en esta realización empleando ensayos basados en la amplificación, preferiblemente, ensayos basados en una PCR. El ARN aislado primero puede someterse a transcripción inversa para producir ADNc antes de la amplificación empleando cebadores y/o sondas específicos para la molécula efectora inmunológica que se va a detectar. Preferiblemente, la detección es cuantitativa. Un método adecuado es la PCR de transcripción inversa (RT-PCR) a tiempo real.

Preferiblemente, la detección de la molécula efectora inmunológica en la etapa (b) es una detección cuantitativa.

Realizaciones específicas

Las realizaciones específicas y preferidas del método según la presente invención y descripción y los componentes utilizados en ellas se describirán a continuación.

Tal como se describió anteriormente, en la etapa (a) pueden incluirse uno o más aditivos adicionales en la composición de incubación. Según una realización, se añade un agente a la composición de incubación para modular la actividad de células T reguladoras (células T-reg). Esto incluye inhibir la función de supresor de las células T-reg. Los agentes que modulan las células T-reg incluidos en la presente incluyen, pero no se limitan a un ligando de CD25, un oligonucleótido sentido o antisentido con respecto a un material genético que codifica JAK1 o TYK2, un anticuerpo neutralizante, un oligonucleótido que contiene CpG, un oligonucleótido que actúa como agente modulador del receptor similar a toll (TLR), y otros agentes moduladores de TLR. En una realización particular, las células T-reg son células supresoras de la respuesta inmunológica cuya actividad es inhibida por el agente modulador. Un "molécula de CpG" significa un oligonucleótido que comprende una secuencia o motivo CpG. Los ejemplos de inhibidores o moduladores de la función de T-reg incluyen ligandos de CD25 que incluyen, pero no se limitan a un anticuerpo policlonal o monoclonal contra CD25, o uno de sus fragmentos de unión al antígeno, anticuerpos policlonales o monoclonales humanizados o desinmunizados contra CD25, o una forma recombinante o sintética de los anticuerpos policlonales o monoclonales. Otros ejemplos de agentes incluyen moléculas de ácidos nucleicos sentido o antisentido dirigidas al ARNm o ADN que codifica la tirosina quinasa Janus 1 (JAK1) o la tirosina quinasa 2 (TYK2) o inhibidores de molécula pequeña de las proteínas JAK1 o TYK2. La referencia a "moléculas pequeñas" incluyen receptores nuevos de antígeno de inmunoglobulina (IgNAR), según se describe en la publicación de patente internacional n.º WO 2005/118629. Otros ejemplos de agentes adecuados son agentes estimulantes, tales como moléculas de CpG que actúan a través de receptores similares a Toll (TLR) y/u otros mecanismos. Por tanto, los oligonucleótidos que contienen CpG y un oligonucleótido que actúa como agente modulador de TLR también forman parte de la presente descripción. Puede utilizarse un único tipo de agente o pueden emplearse dos o más tipos de agentes para modular las células T-reg. Por ejemplo, el ensayo puede

realizarse con un ligando de CD25 y un oligonucleótido sentido o antisentido de JAK1/TYK2; un ligando de CD25 y un agente modulador de TLR; un oligonucleótido sentido o antisentido de JAK1/TYK2 y un agente modulador de TLR; o un ligando de CD25, un oligonucleótido sentido o antisentido de JAK1/TYK2 y un agente modulador de TLR. Como alternativa, solo se emplea un tipo de agente. En otra alternativa, se emplea un oligonucleótido que comprende CpG y un agente modulador de TLR. Los respectivos agentes moduladores de T-reg pueden añadirse por separado a la muestra y/o la composición de incubación o pueden incluirse en la composición que comprende el antígeno y/o el azúcar no reductor.

Según una realización, el método según la presente invención comprende:

(a) preparar una composición de incubación poniendo en contacto una muestra de sangre completa obtenida de un sujeto humano con una composición que comprende al menos un antígeno de péptido y al menos un disacárido no reductor, preferiblemente trehalosa o sacarosa, e incubando la composición de incubación durante al menos 2 horas por encima de la temperatura ambiente; y

(b) detectar la presencia o el nivel de IFN-gamma;

en el que la presencia o el nivel de IFN-gamma es indicativo del nivel de capacidad de respuesta inmunológica mediada por células del sujeto humano.

Preferiblemente, el antígeno de péptido es un antígeno específico de una enfermedad o un patógeno. En la presente se describen ejemplos no limitantes de patógenos. Según una realización, el patógeno es un virus y el método permite determinar si el sujeto humano tiene la capacidad de montar una respuesta inmunológica mediada por células antivírica.

Según una realización, el método comprende además:

(c) comparar el nivel de la molécula efectora inmunológica detectado, o un valor derivado de este, con un nivel de referencia.

La etapa (c) comprende comparar el nivel de la molécula efectora inmunológica determinado, o un valor derivado de este, con un nivel de referencia. Esta realización es particularmente útil para diagnosticar una infección por un patógeno para el cual el antígeno es representativo. Si dicho sujeto está infectado por el patógeno, el nivel de la molécula efectora inmunológica determinado, o un valor derivado de este, está por encima del nivel de referencia, y si dicho sujeto no está infectado por el patógeno, el nivel de la molécula efectora inmunológica determinado, o un valor derivado de este, está por debajo del nivel de referencia. El mismo principio se aplica a determinar si dicho sujeto es capaz de montar una respuesta inmunológica mediada por células contra un patógeno para el cual el antígeno es representativo.

Según una realización, la muestra se divide en al menos dos fracciones, y en la etapa (a), la primera fracción de la muestra se pone en contacto con un antígeno y un azúcar no reductor para generar una muestra de respuesta, y en la que la segunda fracción de la muestra se pone en contacto con una disolución inactiva para generar una muestra de control negativo (nula). En la etapa (b) de esta realización, se determina la presencia o el nivel de la molécula efectora inmunológica en las dos fracciones. En la etapa (c) se determina la respuesta de la molécula efectora inmunológica dependiente del antígeno restando el nivel de la molécula efectora inmunológica determinado en la muestra de control negativo del nivel de la molécula efectora inmunológica determinado en la muestra de respuesta. La respuesta de la molécula efectora inmunológica dependiente del antígeno, o un valor derivado de este, después puede compararse con un nivel de referencia, proporcionando con ello una ayuda para determinar si el sujeto se ha encontrado previamente con el antígeno. Con ello puede determinarse, por ejemplo, si el sujeto ha generado una reactividad inmunológica frente al antígeno, si está en riesgo de desarrollar una enfermedad y/o si es susceptible a una infección con un patógeno.

Opcionalmente, el método puede comprender además dividir la muestra en al menos tres fracciones e incubar la tercera fracción de la muestra con un activador de células T, tal como un mitógeno, para generar una muestra de control positivo. En este caso, las células inmunológicas pueden incubarse, por ejemplo, en tres poblaciones distintas: una muestra de control negativo (por ejemplo, disolución salina), una muestra de respuesta estimulada por el antígeno y una muestra de control positivo (empleando, por ejemplo, un activador de células T, por ejemplo, un mitógeno, tal como fitohemaglutinina). Así, según una realización, la muestra se divide en al menos tres fracciones. En la etapa (a), la primera fracción de la muestra se pone en contacto con un antígeno y un azúcar no reductor para generar una muestra de respuesta, la segunda fracción de la muestra se pone en contacto con una disolución inactiva para generar una muestra de control negativo, y la tercera fracción de muestra se pone en contacto con una disolución de estimulación (que comprende, por ejemplo, un mitógeno) para generar una muestra de control positivo. En la etapa (b) de esta realización, se determina la presencia o el nivel de la molécula efectora inmunológica en las tres fracciones. En la etapa (c), la respuesta de la molécula efectora inmunológica dependiente del antígeno de la muestra de respuesta se determina restando el nivel de la molécula efectora inmunológica determinado en la muestra de control negativo del nivel de la molécula efectora inmunológica determinado en la muestra de respuesta, y comparando la respuesta de la molécula efectora inmunológica dependiente del antígeno, o un valor derivado de este, con un nivel de referencia; la respuesta de la molécula efectora inmunológica de la muestra de control positivo

se determina restando el nivel de la molécula efectora inmunológica determinado en la muestra de control negativo del nivel de la molécula efectora inmunológica determinado en la muestra de control positivo, y comparando la respuesta de la molécula efectora inmunológica resultante con un nivel de referencia, o un valor derivado de este. Con ello puede determinarse si el sujeto se ha encontrado previamente con el antígeno ensayado o con un antígeno que muestra reactividad cruzada con el antígeno ensayado y, así, si ha generado reactividad inmunológica contra el antígeno. Esto proporciona una ayuda valiosa para determinar, por ejemplo, si el sujeto presenta una infección activa, reciente o latente, o si el sujeto está respondiendo a un tratamiento, si va a desarrollar una infección o una enfermedad o si está inmunosuprimido. Por ejemplo, si la respuesta de la molécula efectora inmunológica dependiente del antígeno está por encima del nivel de referencia, el resultado puede evaluarse como positivo, es decir, el sujeto es capaz de producir una respuesta mediada por células contra dicho antígeno. Si la respuesta de la molécula efectora inmunológica dependiente del antígeno está por debajo del nivel de referencia y la respuesta del efector inmunológico dependiente del control positivo está por encima del nivel de referencia, el resultado puede evaluarse como negativo, es decir, el sujeto no es capaz de producir una respuesta mediada por células contra dicho antígeno.

Los mitógenos que pueden utilizarse en la presente invención como control positivo incluyen todos los mitógenos conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (conA), lipopolisacárido (LPS) y mitógeno de fitolaca (PWM). Otros ejemplos de inmunoestimulantes, además de los mitógenos, que pueden utilizarse para proporcionar un control positivo incluyen, pero no se limitan a compuestos químicos, tales como R848.

Tal como se describió anteriormente, en algunas realizaciones, el recipiente en el que la muestra, el antígeno y el azúcar no reductor se incuban es también el recipiente de recogida empleado para recoger la muestra del sujeto. Puede emplearse cualquiera de un gran número de diferentes recipientes disponibles, con la condición de que proporcionen unas dimensiones adecuadas para la muestra. En algunas realizaciones, el recipiente es un tubo que comprende un vacío para facilitar la recogida de la muestra, tal como sangre, de un sujeto. Los respectivos tubos de recogida de sangre al vacío son muy conocidos en la técnica anterior y, por tanto, no es necesaria una descripción detallada en la presente. En otras realizaciones, el recipiente es un tubo capilar. En algunas realizaciones, se emplea un tubo capilar para recoger la sangre de la superficie de la piel mediante una acción capilar. En algunas realizaciones, la muestra se recoge de un sujeto hacia un recipiente de recogida que contiene al menos un antígeno, al menos un azúcar no reductor y al menos un anticoagulante, preferiblemente heparina, o al cual se añade posteriormente un antígeno, un azúcar no reductor y un anticoagulante, preferiblemente heparina. En algunas realizaciones, se toman muestras de sangre empleando un dispositivo de toma de muestras capilar, tal como un dispositivo de punción, y la sangre se introduce en un recipiente de recogida heparinizado y después se traslada a un recipiente apropiado para la incubación con el antígeno y el azúcar no reductor. Preferiblemente, el antígeno, el azúcar no reductor y, opcionalmente, el anticoagulante se proporcionan en forma de una única composición, tal como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, se recoge sangre completa de un sujeto hacia un recipiente que contiene el antígeno, el azúcar no reductor y, opcionalmente, el anticoagulante. En otras realizaciones, el antígeno, el azúcar no reductor y/o el anticoagulante se añaden a la muestra de sangre completa después de la recogida.

La presente invención es particularmente útil para seleccionar la exposición a patógenos, en particular micobacterias, tales como *M. tuberculosis*. Por tanto, la presente descripción divulga un método para medir la actividad de respuesta inmunológica mediada por células en un sujeto, comprendiendo dicho método poner en contacto una muestra que comprende células inmunológicas capaces de producir moléculas efectoras inmunológicas tras la estimulación con un antígeno, con un antígeno específico de la tuberculosis y con un azúcar no reductor. El péptido o péptidos utilizados como antígeno pueden incluir todo o parte de un antígeno de proteína de *M. tuberculosis*. Después de la incubación se determina el nivel de la molécula efectora inmunológica, preferiblemente interferón gamma, producida por las células inmunológicas, en el que el nivel de la molécula efectora inmunológica es indicativo del nivel de la capacidad de respuesta inmunológica mediada por células frente a *M. tuberculosis*.

ESAT-6 es una diana antigénica segregada temprana de 6 kDa de *M. tuberculosis*. La proteína de ESAT-6 ("early secreted antigenic target 6", diana antigénica segregada temprana 6) es un importante antígeno segregado que se ha purificado a partir de filtrados de cultivos a corto plazo de *M. tuberculosis*. Tal como se indica en la presente ESAT-6, CFP-10 ("culture filtrate protein 10", proteína de filtrado de cultivo 10) y 85B pueden obtenerse a partir del lisado y purificación de células, mediante técnicas recombinantes o pueden producirse como péptidos sintéticos. Por ejemplo, ESAT6 puede obtenerse como una proteína recombinante de Statens Serum Institute (SSI, Copenhague, Dinamarca). Otros antígenos de proteína diana adecuados para *M. tuberculosis* incluyen TB7.7 y TB37.6. CFP10 también se conoce como la proteína similar a ESAT-6 eesxB y proteína antigénica segregada MTS-A-10.

La tuberculina o PPD ("purified protein derivative", derivado de proteína purificado) se diferencia de ESAT-6 (diana antigénica segregada temprana 66), CFP-10 (proteína de filtrado de cultivo 10), y TB7.7, que son codificados por genes (en la región RD-1) localizados solo dentro del genoma de *M. tuberculosis* y no están contenidos en BCG (bacilo de Calmette-Guerin). Se diferencia de PPD porque PPD también contiene otros antígenos que son compartidos, por ejemplo, con subcepas de BCG y con varias especies micobacterianas no tuberculosas con baja o ninguna patogenicidad. Según una realización, se emplea PPD como antígeno. De modo específico, tal como se

emplea en la presente, la expresión derivado de proteína purificado ("Purified Protein Derivative", PPD o tuberculina) es un precipitado de moléculas no específicas de especie. El PPD o tuberculina se obtiene extrayendo proteínas de una mezcla de *M. tuberculosis* u otras micobacterias, tales como *M. avium*. El PPD se emplea habitualmente para ensayar la presencia de inmunidad celular o la respuesta de Th1 generada contra BCG o contra *M. tuberculosis*. Por ejemplo, puede obtenerse en TubersolB de Connaught Laboratories Limited preparado a partir de un lote maestro mayor, Master Batch, Connaught Tuberculin (CT68), o en forma de RT23 obtenido en Statens Serum Institute (SSI, Copenhague, Dinamarca).

Preferiblemente, el antígeno se selecciona de CFP10, ESAT-6, TB7.7 y TB37.6 de *Mycobacterium tuberculosis*. Según una realización, el antígeno es proporcionado por péptidos que se corresponden con estos antígenos de proteína y/o que muestran reactividad cruzada con estos.

En una realización, la muestra se pone en contacto con una combinación de péptidos CD4⁺ y CD8⁺, que han sido descritos en detalle anteriormente. Se remite a la anterior descripción.

Las células del sistema inmunológico pierden la capacidad de montar una respuesta inmunológica mediada por células en sangre completa después de periodos largos tras la extracción de sangre del sujeto, y las respuestas sin intervención a menudo se encuentran gravemente reducidas o ausentes a las 24 horas después de la extracción de sangre. La reducción del trabajo y de la necesidad de un equipo especializado en la presente invención permite realizar una estimulación de la respuesta inmunológica mediada por células con antígenos en la localización sanitaria, tal como consultas de médicos, clínicas, instalaciones ambulatorias y clínicas veterinarias o en granjas. Tras haber completado la estimulación con antígenos, ya no son necesarias células frescas y activas. El IFN-gamma y otras citoquinas o moléculas efectoras inmunológicas liberadas debido a la estimulación con el antígeno son estables en fluidos sin células o mermados en células, tales como plasma, y, así, la muestra puede conservarse o trasladarse sin condiciones especiales o requerimientos de rapidez de una forma similar a las muestras convencionales de plasma o suero empleadas para otros diagnósticos de enfermedades infecciosas u otras enfermedades. Por tanto, se prefiere la detección de las moléculas efectoras inmunológicas liberadas reales. Sin embargo, las células comprendidas en la composición de incubación o la composición de incubación completa pueden ponerse en contacto, después de la incubación, con una composición estabilizante de ácidos nucleicos que comprende reactivos que estabilizan el patrón de expresión de ARN, si se determina la presencia o el nivel de la molécula efectora inmunológica basándose en el nivel de expresión de ARN de la molécula efectora inmunológica. En el mercado están disponibles varias composiciones estabilizantes. Por ejemplo, PreAnalytiX proporciona composiciones que contienen reactivos para la estabilización inmediata del perfil de expresión génica de ARN en sangre. Las respectivas composiciones también pueden utilizarse para estabilizar el perfil de expresión génica de ARN de las células comprendidas en la composición de incubación. La respectiva composición de estabilización permite el transporte y la conservación a temperatura ambiente sin el riesgo de que se produzcan cambios en el perfil de ARN mediante la inducción de genes y la degradación de transcritos (véanse, por ejemplo, los documentos US 6.617.170, US 7.270.953, Kruhoffer *et al.*, 2007). Las respectivas composiciones se comercializan con el nombre de tubos de ARN de sangre PAXgene Blood RNA Tubes.

Aplicaciones, enfermedades y trastornos

A continuación se describirán aplicaciones no limitantes, que incluyen usos, enfermedades y trastornos. Tal como será evidente a partir de esto, el método según la invención, así como las composiciones y kits descritos en la presente, pueden emplearse ampliamente en el campo médico y de diagnóstico y pueden utilizarse, por ejemplo, en ensayos *in vitro* adecuados para analizar la capacidad de respuesta mediada por células de pacientes. Además, el método según la invención, así como las composiciones y kits descritos en la presente, son herramientas analíticas valiosas para ensayar la capacidad de agentes, tales como, por ejemplo, productos inmunoterapéuticos del cáncer, para estimular y, por tanto, potenciar la inmunidad mediada por células.

El método divulgado en la presente permite, por ejemplo, la detección de la presencia o la ausencia, o el nivel o estadio de una enfermedad o un trastorno en un sujeto, tal como una infección por un agente patógeno, una enfermedad autoinmunitaria, cáncer, exposición a un agente inflamatorio, exposición a un medicamento, exposición a un agente proteico tóxico, y trastornos de inmunodeficiencia o inmunosupresión, tales como los inducidos por un trastorno de enfermedad o inducidos por agentes farmacéuticos. La capacidad para medir, de modo fiable y sensible, la inmunidad mediada por células es importante, por ejemplo, para evaluar la capacidad de un sujeto para responder a una infección por un agente patógeno, tal como un microorganismo, virus o parásito, para montar una respuesta autoinmunitaria, para responder a una vacuna o a un producto inmunoterapéutico, para protegerse frente a cánceres u otros trastornos oncológicos, para detectar un trastorno inflamatorio o para detectar la exposición o la sensibilidad de un sujeto frente a un agente tóxico, tal como berilio o agentes ambientales. El ensayo descrito en la presente permite la detección temprana y/o más sensible de la capacidad de inmunorrespuesta. El ensayo descrito en la presente también permite y ayuda a la detección de trastornos de enfermedad que conducen a una inmunosupresión o para detectar una inmunosupresión inducida por medicamentos. En consecuencia, "medir una respuesta inmunológica mediada por células en un sujeto", tal como se divulga en la presente, tiene muchas aplicaciones útiles en el campo médico y, a continuación, se describirán aplicaciones y usos no limitantes.

Por ejemplo, el método descrito en la presente puede emplearse para el inmunodiagnóstico de enfermedades infecciosas y autoinmunitarias, como marcador para la inmunocompetencia, así como marcador para enfermedades inflamatorias, alérgicas, cáncer, el efecto de productos inmunoterapéuticos, y como marcador para agentes tóxicos. Además, el método es útil, en general, para la detección de respuestas de células T a antígenos endógenos y/o exógenos (que incluyen la medición de la eficacia de una vacuna).

Los ensayos de respuesta inmunológica funcionales basados en células también son aceptados como marcadores sustitutos de la eficacia en el desarrollo de vacunas, productos inmunoterapéuticos y biológicos que producen un impacto en las respuestas inmunológicas. Los ensayos pueden emplearse en entornos académicos, en entornos farmacéuticos y en la investigación y el desarrollo de vacunas y productos biológicos. La evaluación de la capacidad funcional de las células inmunológicas es fundamental para comprender varios trastornos de enfermedad y la eficacia de estrategias terapéuticas dirigidas a ellos. Las células inmunológicas son responsables de la prevención o la terapia, por ejemplo, en enfermedades infecciosas, tales como VIH, o son responsables del propio trastorno de enfermedad, por ejemplo, en trastornos de enfermedad autoinmunitarios. La reactividad específica de autoantígenos puede medirse en pacientes afectados por una enfermedad autoinmunitaria, tal como la esclerosis múltiple, empleando el método según la presente invención. La presente invención proporciona ensayos que son útiles para estos objetivos.

En la actualidad se están ensayando numerosas estrategias de inmunoterapia del cáncer en ensayos clínicos. Aunque la eficacia clínica sería el ensayo final de estas estrategias, el camino largo y complicado del desarrollo de estos artículos necesita de la evaluación de las respuestas inmunológicas como marcadores intermedios de los candidatos más probables para que tengan éxito. Esto enfatiza la necesidad de ensayos que detecten y cuantifiquen, de modo preciso, las respuestas inmunológicas específicas de antígeno mediadas por células T. Para los respectivos agentes inmunoterapéuticos que, por ejemplo, no se espera necesariamente que provoquen la regresión de un tumor, pero que siguen teniendo un efecto beneficioso sobre la enfermedad, debe elegirse un marcador biológico basándose en el presunto modo de actividad. Para la inmunoterapia, este marcador es la estimulación de la respuesta inmunológica específica de antígeno de tumor que puede ser detectada por uno o más ensayos inmunológicos. En la presente, se emplean preferiblemente ensayos que evalúan la función de las células T citotóxicas CD8⁺ que reconocen directamente a los péptidos de tumor presentados por moléculas de MHC sobre la superficie de una célula tumoral como activador para la citólisis directa y las respuestas de células T auxiliares CD4⁺, en particular de células T auxiliares de tipo 1, que conducen a la generación de células T citotóxicas. La presente invención proporciona ensayos que son útiles para este objetivo debido a su sensibilidad y fiabilidad. Así, el método, los kits y las composiciones descritos en la presente pueden emplearse para analizar si un agente farmacéutico, tal como, por ejemplo, un producto inmunoterapéutico del cáncer, es capaz de potenciar la inmunidad mediada por células. Esto puede ensayarse, por ejemplo, a nivel general empleando células inmunológicas disponibles, por ejemplo, estandarizadas (cuyos ejemplos se han descrito anteriormente) o también puede ensayarse en un paciente individual para analizar si el producto inmunoterapéutico específico, tal como, por ejemplo, un producto inmunoterapéutico del cáncer, es capaz de potenciar la inmunidad mediada por células en dicho paciente. Este ensayo es valioso para el desarrollo clínico, así como en el posterior entorno terapéutico, para analizar si un paciente se beneficiaría de una terapia con un producto inmunoterapéutico. Los ejemplos de productos inmunoterapéuticos incluyen, pero no se limitan a productos biológicos, tales como anticuerpos terapéuticos que potencian la actividad de células T, en particular células T citotóxicas. El modo de acción no es importante, con la condición de que produzca o se suponga que produzca una estimulación/aumento de la inmunidad mediada por células. Por ejemplo, la actividad puede potenciarse mediante la estimulación directa de las células inmunológicas o reduciendo o apagando los mecanismos inhibidores que afectan negativamente a la actividad de dichas células T, estimulando/aumentando indirectamente con ello la inmunidad mediada por células. Un ejemplo es el anticuerpo inmunoterapéutico del cáncer ipilimumab.

Además, el método según la presente invención puede utilizarse para detectar la presencia, la ausencia, el nivel o el estadio de una enfermedad o un trastorno en un sujeto, en el que la presencia o el nivel de la molécula efectora inmunológica detectado empleando el método según la presente invención es indicativo de la enfermedad o el trastorno.

Además, el método según la presente invención puede utilizarse para determinar si un agente o un trastorno de enfermedad induce o está asociado con la inmunosupresión en un sujeto, en el que la presencia o el nivel de la molécula efectora inmunológica detectado empleando el método según la presente invención es indicativo del grado de inmunosupresión inducido por el agente o inducido o asociado con el trastorno de enfermedad.

Un aspecto de la presente solicitud incluye métodos que demuestran la capacidad de respuesta inmunológica mediada por células de un sujeto midiendo la capacidad de respuesta a un antígeno concreto empleando el método según la presente invención. En una realización, una muestra, tal como sangre completa, una fracción enriquecida en leucocitos o un lavado bronquioalveolar puede obtenerse de un sujeto que padece o que se sospecha que va a desarrollar una enfermedad concreta (por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad provocada por una infección con un agente patógeno, o la exposición a un agente tóxico) y la respuesta inmunológica se mide empleando el método de la presente invención, por ejemplo, detectando moléculas efectoras inmunológicas liberadas de células T efectoras (por ejemplo, células T CD4⁺ y/o células T citotóxicas CD8⁺) en respuesta a la estimulación con el antígeno. El método de la presente invención es particularmente útil para detectar y/o controlar

una enfermedad o un trastorno, que incluye el nivel o el estadio de la enfermedad o trastorno en un sujeto, tal como una infección por un agente patógeno, una enfermedad autoinmunitológica, cáncer o un trastorno inflamatorio. Otros trastornos incluyen la exposición a agentes tóxicos, tales como berilio. El ensayo de la presente invención también es útil para controlar protocolos terapéuticos.

- 5 La presencia el nivel de a molécula efectora inmunitológica producida en respuesta al antígeno ensayado es indicativo del nivel de la capacidad de respuesta inmunitológica mediada por células del sujeto. En particular, el nivel de la capacidad de respuesta es indicativo de la presencia o la ausencia o del nivel o estadio de una enfermedad o un trastorno seleccionado de la lista que comprende una infección por un agente patógeno, una enfermedad autoinmunitológica, un cáncer, un trastorno inflamatorio, y la exposición a un agente tóxico. En particular, la presencia
10 o el nivel de la molécula efectora inmunitológica detectada es indicativo de la presencia, la ausencia, el nivel o el estadio de una enfermedad o un trastorno para el cual el antígeno ensayado es representativo.

El método también puede utilizarse para controlar una respuesta a un protocolo terapéutico para una enfermedad o un trastorno en un sujeto. La presencia, el nivel o el patrón de la molécula efectora inmunitológica producida puede ser indicativo de la eficacia del protocolo terapéutico.

- 15 El método de la presente invención también puede indicarse como un "ensayo". El método es un método *ex vivo*. El ensayo descrito en la presente es útil, entre otras cuestiones, para evaluar la capacidad de respuesta inmunitológica general de un sujeto o es útil para detectar la capacidad de respuesta a trastornos de enfermedad específicos, tales como una enfermedad autoinmunitológica, enfermedad celíaca, cáncer o infección por un organismo patógeno o un agente, exposición a un agente tóxico o medicamento, y trastornos de inmunodeficiencia o inmunosupresión, tales
20 como los inducidos por un trastorno de enfermedad o por un agente terapéutico.

En una realización, el sujeto es un ser humano y el ensayo de respuesta inmunitológica mediada por células se emplea para seleccionar la capacidad de respuesta a microorganismos patógenos, virus y parásitos, el potencial para desarrollar un trastorno autoinmunitológico o para controlar un trastorno autoinmunitológico, enfermedad celíaca, controlar la respuesta de un sujeto a una exposición oncológica y para determinar la presencia de cualquier
25 inmunodeficiencia o inmunosupresión. Esto último puede aparecer, por ejemplo, debido a ciertos medicamentos, que incluyen diversos agentes quimioterapéuticos. Como alternativa, puede ensayarse la exposición a venenos ambientales y contaminantes. En una realización, los trastornos de enfermedad que conducen a la inmunosupresión incluyen la infección crónica y el cáncer. Otros trastornos de enfermedad que pueden conducir a la inmunosupresión incluyen trastornos de enfermedad inflamatorios. Los medicamentos que pueden conducir a la inmunosupresión
30 incluyen los empleados para tratar la artritis reumatoide, el cáncer y la enfermedad del intestino inflamatoria o los que se administran junto con un transplante de órganos.

En una realización, el método descrito en la presente puede utilizarse para el diagnóstico o el control, o como ayuda para estos, de sujetos sospechosos de padecer tuberculosis (por ejemplo, una infección por TB activa, latente o reciente) y, en particular, de pacientes con un mayor riesgo de avance desde la tuberculosis latente hasta la
35 tuberculosis activa, por ejemplo, en pacientes que reciben medicación inmunosupresora (concretamente, un tratamiento con anticuerpos monoclonales (anticuerpo anti-CD20 (por ejemplo, Rituximab®) o un tratamiento bloqueantes de TNF-alfa (por ejemplo, Remicade®, Enbrel®, Humira®)) o esteroides o quimioterapia del cáncer, o pacientes que padecen trastornos inmunosupresores (por ejemplo, infección por VIH, cáncer, IDDM o diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM), trastornos autoinmunitológicos, malnutrición, envejecimiento, uso de
40 fármacos intravenosos (IVDU) o trastornos inmunitológicos heredados), y en individuos que han sido recientemente infectados.

En una realización, el método descrito en la presente puede emplearse para controlar sujetos diagnosticados con infecciones u otros trastornos de enfermedad. Esto puede ayudar, por ejemplo, a evaluar la eficacia del tratamiento durante y después de la terminación de un tratamiento, por ejemplo, controlando y prediciendo la posible recurrencia
45 de la infección.

Según una realización, el método es para determinar si un sujeto está infectado y/o es capaz de montar una respuesta inmunitológica mediada por células contra un patógeno para el cual el antígeno es representativo.

Los agentes patógenos o infecciones incluyen bacterias, parásitos y virus. Los ejemplos de bacterias incluyen microorganismos Gram positivos y Gram negativos, tales como especies de *Mycobacterium*, especies de
50 *Staphylococcus*, especies de *Streptococcus*, *Escherichia coli*, especies de *Salmonella*, especies de *Clostridium*, especies de *Shigella*, especies de *Proteus*, especies de *Bacillus*, especies de *Hemophilus*, especies de *Borrelia*, entre otros. *Mycobacterium tuberculosis* es una diana particularmente útil, así como los trastornos que surgen de la infección por *M. tuberculosis*, tal como tuberculosis (TB). Los ejemplos de virus incluyen el virus de la hepatitis (virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis C), herpes virus y virus CMV, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), así
55 como las enfermedades que resultan de estos. Los parásitos incluyen especies de *Plasmodium*, tiña, parásitos hepáticos y similares. Otros agentes patógenos incluyen células eucariotas, tales como levaduras y hongos. En general, es importante evaluar el potencial o la capacidad de respuesta mediada por células real en sujetos expuestos a estas entidades infecciosas. El método de la presente descripción también puede utilizarse para detectar la presencia o la ausencia de estas infecciones, así como el nivel o el estadio del proceso de enfermedad.

El método también puede utilizarse para controlar el nivel de inmunidad mediada por células contra ciertas enfermedades y/o agentes infecciosos en personas que están en riesgo de desarrollar la respectiva enfermedad. Un ejemplo es una infección por CMV en pacientes inmunosuprimidos, tales como pacientes con trasplantes de órganos. Las infecciones por CMV aparecen con frecuencia como una complicación de la inmunosupresión, en particular después de un trasplante, y contribuyen significativamente a la morbilidad y la mortalidad en receptores de trasplantes. Las actuales terapias inmunosupresoras empleadas para evitar el rechazo a un órgano trasplantado tienen efectos perjudiciales sobre los linfocitos T y, por tanto, sobre las respuestas inmunológicas mediadas por células, produciendo una mayor susceptibilidad a las infecciones víricas después del trasplante. La importancia de la función de la células T y la supresión de la replicación de CMV también es enfatizada por el hecho de que los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) específicos de CMV pueden proteger frente a la patogénesis asociada con los virus. Otro ejemplo de pacientes inmunosuprimidos son los pacientes infectados por VIH. El método de la presente invención puede emplearse para controlar en serie el nivel de inmunidad de la enfermedad, tal como, por ejemplo, la inmunidad anti-CMV, en personas en riesgo de desarrollar una respectiva enfermedad, puesto que la pérdida de la función inmunológica puede asociarse con el desarrollo de una enfermedad, tal como una enfermedad por CMV. Preferiblemente, se determina el interferón gamma como molécula efectora en un respectivo ensayo. El estado inmunológico del receptor de un trasplante puede influir en la (re)activación del CMV en receptores de trasplantes. Por ejemplo, una robusta respuesta de interferón gamma inducida por un antígeno específico por CMV indica un menor riesgo de enfermedad de CMV, puesto que el paciente presenta una fuerte respuesta mediada por células y, por tanto, presenta protección frente al virus. Una respuesta mínima de interferón gamma indica un mayor riesgo de enfermedad por CMV, puesto que no existe o existe muy poca inmunidad mediada por células. Los datos demuestran que pacientes con un ensayo de CMV positivo permanecen exentos de enfermedades por CMV significativamente más a menudo y durante más tiempo que los pacientes con un ensayo negativo después del cese de la profilaxis antivírica. Así, los pacientes que presenten una respuesta inmunológica celular al CMV al final de la profilaxis tienen un riesgo significativamente menor de desarrollar una enfermedad por CMV que los que no presentan una respuesta inmunológica detectable. Por tanto, el método según la presente invención puede predecir el desarrollo de una enfermedad por CMV de aparición tardía en receptores de trasplantes y, por tanto, es muy útil en el tratamiento de pacientes.

Como alternativa, el sujeto puede presentar o puede ensayarse para un trastorno de enfermedad seleccionado de la enfermedad celíaca, diabetes autoinmunitaria, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípidos, enfermedad de Addison autoinmunitaria, esclerosis múltiple, enfermedad autoinmunitaria de la glándula adrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide bulloso, cardiomiopatía, dermatitis-espuma celíaca, síndrome de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía inflamatoria crónica desmielinizante, síndrome de Churg-Straus, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de la aglutinina fría, enfermedad de Crohn, dermatitis herpetiforme, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática ("idiopathic thrombocytopenia purpura", ITP), nefropatía de IgA, diabetes dependiente de insulina (tipo I), liquen plano, lupus, enfermedad de Meniere, enfermedad del tejido conectivo mixta, esclerosis múltiple, miastenia grave, 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, escleroderma, síndrome de Sjogren, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitíligo y enfermedad del intestino inflamatoria.

Como alternativa, el sujeto puede padecer o puede ser ensayado para un cáncer. La terapia del cáncer también depende de cierta forma de la inmunidad mediada por células, y el propio cáncer o los fármacos empleados para tratar el cáncer pueden conducir a una inmunosupresión. Los cánceres contemplados en la presente incluyen un grupo de enfermedades y trastornos que se caracterizan por un crecimiento celular incontrolado (por ejemplo, formación de un tumor) sin diferenciación de estas células en células especializadas y diferentes. Estas enfermedades y trastornos incluyen protooncogén ABL1, cánceres relacionados con SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenoquístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnógena, alopecia, sarcoma de partes blandas alveolar, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres óseos, cáncer de intestino, glioma del tronco cerebral, tumores cerebrales y del SNC, cáncer de mama, tumores del SNC, tumores carcinoides, cáncer cervical, tumores cerebrales infantiles, cáncer infantil, leucemia infantil, sarcoma de tejidos blandos infantil, condrosarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cánceres colorrectales, linfoma de células T cutáneo, dermatofibrosarcoma protuberans, tumor de células redondas y pequeñas desmoplásico, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma de ojo, retinoblastoma, cáncer del tubo 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, malignidades hematológicas, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, papilomavirus humano, lunar hidatidiforme, hipercalcemia, cáncer de hipofaringe, 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 hodgkiniano, 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 fungoides, síndromes de mielodisplasia, mieloma, enfermedades mieloproliferativas, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de rotura de Nijmegen, cáncer de un tipo que no es melanoma, cáncer de pulmón no microcítico ("non small cell lung cancer", NSCLC), cánceres oculares, cáncer esofágico, cáncer de la cavidad oral, cáncer de la orofaringe, osteosarcoma, cáncer de ovario de ostomía, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer paratiroidal, cáncer de la glándula parótida, cáncer de pene, tumores neuroectodérmicos periféricos, cáncer de la pituitaria, policitemia vera, cáncer de próstata, cánceres raros y trastornos asociados, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, síndrome de Rothmund-Thomson, cáncer de glándulas salivares, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de microcítico ("small cell lung cancer", SCLC), cáncer del intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, tumores de la médula espinal, carcinoma de células escamosas (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer testicular, cáncer del timo, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición (vejiga), cáncer de células de transición (renal-pélvico/uréter), cáncer trofoblástico, cáncer uretral, cáncer del sistema urinario, uroplaquias, sarcoma uterino, cáncer de útero, cáncer vaginal, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms.

Como alternativa, el sujeto estar expuesto o puede ser ensayado para la exposición a un veneno de proteína.

Las enfermedades autoinmunitarias contempladas en la presente para su detección y/o control incluyen, entre otras, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípidos, enfermedad de Addison autoinmunitaria, esclerosis múltiple, enfermedad autoinmunitaria de la glándula adrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide bulloso, cardiomiopatía, dermatitis-espúlea celíaca, síndrome de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía inflamatoria crónica desmielinizante, síndrome de Churg-Straus, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de la aglutinina fría, enfermedad de Crohn, dermatitis herpetiforme, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía de IgA, diabetes dependiente de insulina (tipo I), liquen plano, lupus, enfermedad de Meniere, enfermedad del tejido conectivo mixta, esclerosis múltiple, miastenia grave, 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, escleroderma, síndrome de Sjogren, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis y vitiligo.

Otros trastornos de enfermedad contemplados incluyen trastornos de enfermedad inflamatorios, puesto que pueden conducir a una inmunosupresión. Los ejemplos de trastornos de enfermedad inflamatorios contemplados por la presente descripción incluyen, pero no se limitan a las enfermedades y trastornos que surgen en respuesta al enrojecimiento, el hinchamiento, el dolor y una sensación de calor en ciertas áreas que están encaminados a proteger a los tejidos afectados por una lesión o una enfermedad. Las enfermedades inflamatorias que pueden tratarse utilizando los métodos de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a acné, angina, artritis, enfermedad de neumonía de aspiración, empiema, gastroenteritis, inflamación, gripe intestinal, NEC, enterocolitis necrotizante, enfermedad inflamatoria pélvica, faringitis, PID, pleuresía, infección de garganta, enrojecimiento, rubor, dolor de garganta, gripe estomacal e infecciones de tracto urinario, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica. En términos de aplicaciones no humanas, la presente descripción se extiende a detectar EIPH en caballos y diversos trastornos en animales, tales como enfermedad de tumor facial en el diablo de Tasmania.

En los anteriores aspectos, el antígeno puede derivarse de un agente patógeno, puede estar asociado con el trastorno de enfermedad o el cáncer o puede ser un veneno. Como alternativa, la infección, el trastorno de enfermedad, el cáncer o el veneno puede suprimir la inmunidad mediada por células, en cuyo caso puede emplearse cualquier antígeno al cual el sujeto ha sido previamente expuesto.

Las realizaciones particularmente ventajosas descritas en la descripción y en las reivindicaciones del método según el primer aspecto se vuelven a describir a continuación. Según el primer aspecto, la presente descripción proporciona un método para medir una actividad de respuesta inmunológica mediada por células, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar una composición de incubación poniendo en contacto una muestra que comprende células inmunológicas capaces de producir moléculas efectoras inmunológicas tras la estimulación con un antígeno, con al menos un antígeno y con al menos un azúcar no reductor, y

(b) detectar la presencia o el nivel de al menos una molécula efectora inmunológica.

Según una realización, el azúcar no reductor es un disacárido no reductor, preferiblemente seleccionado de

trehalosa y sacarosa. La concentración del azúcar no reductor en la composición de incubación es, según una realización, de al menos 1,5 mg/ml, preferiblemente de al menos 2 mg/ml. Los intervalos adecuados para la concentración del azúcar no reductor en la composición de incubación también se describieron anteriormente y se indican en la anterior descripción.

- 5 Según una realización, el azúcar no reductor se selecciona de trehalosa, manitol, sacarosa y rafinosa. Tal como se demuestra en los ejemplos, estos azúcares no reductores aumentan los niveles de respuesta. La trehalosa es particularmente preferida porque, en la presente, se observó el mayor aumento en el nivel de respuesta. Además, el efecto potenciador puede mantenerse durante la conservación.

- 10 Según una realización, en la etapa (a), la muestra se pone en contacto con una composición que comprende el antígeno y el azúcar no reductor. Según una realización, cuando la muestra es una muestra de sangre completa, la composición comprende además un anticoagulante, preferiblemente heparina. Según una realización, la composición que comprende el antígeno, el azúcar no reductor y, opcionalmente, un anticoagulante, está comprendida en un recipiente de recogida de muestras. Tal como se describe en la presente, dicho recipiente de recogida de muestras puede ser, por ejemplo, un recipiente de recogida de sangre al vacío. Según una realización, la composición es una composición secada por pulverización. En la presente se describen realizaciones adecuadas.

Según una realización, la composición tiene una o más de las siguientes características:

- i) la muestra se obtiene de un sujeto humano;
- ii) la muestra se obtiene de un sujeto humano que está inmunosuprimido o es inmunodeficiente;
- 20 iii) la muestra comprende células inmunológicas seleccionadas del grupo que consiste en células NK, células T, células B, células dendríticas, macrófagos y monocitos; y/o
- iv) la muestra es sangre completa.

Según una realización, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en péptidos, proteínas, que incluyen glicoproteínas, fosfoproteínas y fosfolipoproteínas, carbohidratos, fosfolípidos y fragmentos de los anteriores, y preferiblemente es proporcionado por uno o más péptidos.

- 25 Según una realización, se emplean dos o más antígenos diferentes en la etapa (a) y/o se detectan dos o más moléculas efectoras diferentes en la etapa (b).

- Según una realización, se emplean uno o más péptidos como antígenos que tienen una longitud seleccionada de 5 a 100 aminoácidos, o de 7 a 50 aminoácidos. Según una realización ventajosa, el antígeno es proporcionado por uno o más péptidos que son reconocidos por una célula T citotóxica CD8⁺. Preferiblemente, en esta realización, el antígeno es proporcionado por uno o más péptidos que tienen una longitud menor que 15 aminoácidos, preferiblemente que tienen una longitud seleccionada de 7-14 aminoácidos. Los detalles de los respectivos péptidos se describieron anteriormente y se indican en la anterior descripción.
- 30

- Según una realización, el antígeno es proporcionado por al menos dos conjuntos de péptidos, comprendiendo el primer conjunto al menos un péptido con una longitud de aproximadamente 7 a 14 aminoácidos, y un segundo conjunto que comprende al menos un péptido de 15 restos aminoácidos o más, en el que dichos péptidos incluyen todo o parte de un antígeno de proteína. Los detalles de los respectivos conjuntos de péptidos se describieron anteriormente y se indican en la anterior descripción.
- 35

Según una realización ventajosa, el antígeno es proporcionado por uno o más péptidos sintéticos. Los detalles del péptido o péptidos se describieron anteriormente y se indican en la anterior descripción.

- 40 Según una realización, la muestra se pone en contacto con un antígeno asociado o que es representativo de una enfermedad o un trastorno para el cual se va a ensayar la respuesta inmunológica mediada por células. Según una realización ventajosa, el antígeno es un antígeno específico de enfermedad, en particular un antígeno específico de patógeno. Por ejemplo, el antígeno puede derivarse y, por tanto, puede presentar reactividad cruzada con un antígeno procedente de un patógeno asociado con un trastorno de enfermedad o es un antígeno asociado a tumor asociado con un cáncer. Tal como se describió anteriormente, el patógeno puede ser una bacteria, un virus, un parásito, una levadura o un hongo. A continuación se describirán ejemplos no limitantes. Por ejemplo, la bacteria puede seleccionarse de microorganismos Gram positivos y Gram negativos, en particular especies de *Mycobacterium*, tales como *Mycobacterium tuberculosis*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Streptococcus*, *Escherichia coli*, especies de *Salmonella*, especies de *Clostridium*, especies de *Shigella*, especies de *Proteus*, especies de *Bacillus*, especies de *Hemophilus* y especies de *Borrelia*. El virus puede seleccionarse del virus de la hepatitis, tal como el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C, herpes virus, virus CMV y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El parásito puede seleccionarse de especies de *Plasmodium*, tiña y parásitos hepáticos.
- 45
- 50

Según una realización, el antígeno procede o es específico de un virus, preferiblemente citomegalovirus (CMV).

Preferiblemente, dicho antígeno es proporcionado por uno o más péptidos que tienen una longitud de 7 a 14 restos aminoácidos, de 7 a 13 restos aminoácidos, o de 8 a 12 restos aminoácidos. Tal como se describió anteriormente, dichos uno o más péptidos pueden ser péptidos sintéticos.

5 Según una realización, la molécula efectora inmunológica detectada en la etapa (b) tiene una o más de las siguientes características:

i) es una citoquina;

ii) es una quimioquina;

iii) se produce en respuesta a la activación, la estimulación o la reestimulación de células por el antígeno;

10 iv) se selecciona del grupo que consiste en interferones, interleuquinas (IL), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor estimulante de colonias (CSF), tal como CSF de granulocitos ((G)-CSF) o CSF de macrófagos granulocitos ((GM)-CSF), componente 5a del complemento (C5a), Gro α (CXCL1), sICAM-1 (CD54), IP-10 (CXCL10), I-TAC (CXCL11), MCP-1 (CCL2), MIF (GIF), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), serpina E1 (PAI-1), RANTES (CCL5) o MIG (CXCL9); y/o

v) la molécula efectora inmunológica es IFN-gamma.

15 Según una realización del método, la presencia o el nivel de una molécula efectora inmunológica se determina basándose en la molécula efectora inmunológica o se determina basándose en el nivel de expresión del ARN de la molécula efectora inmunológica. Anteriormente se describieron realizaciones adecuadas.

20 Según una realización, el método según cualquiera de las realizaciones anteriores es para controlar o determinar la presencia, la ausencia, el nivel o el estadio de una enfermedad o un trastorno seleccionado del grupo que consiste en una infección por un agente patógeno, una enfermedad autoinmunitaria, un cáncer, un trastorno inflamatorio, la exposición a un agente tóxico, la respuesta a un agente terapéutico, una inmunodeficiencia y una inmunosupresión. Preferiblemente, la magnitud de la respuesta inmunológica mediada por células se correlaciona con el estado, el avance y/o la gravedad de un trastorno de enfermedad. Según una realización, el método según cualquiera de las realizaciones anteriores es para detectar o controlar una enfermedad, una infección y/o la respuesta a una terapia, en particular una inmunoterapia o una terapia con agentes inmunosupresores.

25 Según una realización, el método según cualquiera de las realizaciones anteriores comprende:

30 (a) proporcionar una composición de incubación poniendo en contacto una muestra de sangre completa obtenida de un sujeto humano con una composición que comprende al menos un antígeno de péptido y al menos un disacárido no reductor, preferiblemente trehalosa o sacarosa, e incubando la composición de incubación durante al menos 2 horas; y

(b) medir la presencia o el nivel de IFN-gamma liberado debido a la estimulación con el antígeno;

en el que la presencia o la cantidad de IFN-gamma detectado es indicativa del nivel de capacidad de respuesta inmunológica mediada por células del sujeto humano.

Según una realización, el método según cualquiera de las realizaciones anteriores comprende:

35 (c) comparar el nivel de la molécula efectora inmunológica determinado, o un valor derivado de este, con un nivel de referencia.

40 La presente descripción proporciona además un método de tratamiento de un sujeto que padece una infección patogénica, un trastorno autoinmunitario o un cáncer o una propensión a desarrollar dicho trastorno o enfermedad, comprendiendo dicho método realizar el método para medir la actividad de respuesta mediada por células según el primer aspecto, en el que la presencia o el nivel determinado de la molécula efectora inmunológica es indicativo del nivel de la capacidad de respuesta mediada por células del sujeto, lo cual es indicativo de la presencia, la ausencia, el nivel o el estado del trastorno o la afección, y después tratar el trastorno o la afección. Los detalles del método según el primer aspecto se describieron anteriormente y se indican en la anterior descripción.

Composiciones, kits y usos

45 La reivindicación 14 define una composición para inducir una respuesta inmunológica mediada por células en una muestra, que comprende:

a) al menos un antígeno de péptido que tiene una longitud seleccionada de 5 a 50 aminoácidos, en la que el antígeno es un antígeno específico de enfermedad;

50 b) al menos un azúcar no reductor capaz de aumentar la respuesta de interferón-gamma de las células inmunológicas que responden al antígeno; y

c) al menos un anticoagulante, en la que el anticoagulante es heparina.

También se describe una composición para inducir una respuesta inmunológica mediada por células en una muestra, que comprende:

- a) al menos un antígeno aislado;
- 5 b) al menos un azúcar no reductor;
- c) opcionalmente al menos un anticoagulante.

Los detalles con respecto a la composición, la forma de la composición, los antígenos, azúcares no reductores y anticoagulantes adecuados se describieron anteriormente junto con el método según la presente invención y se indican en la anterior descripción. Dicha composición puede utilizarse, por ejemplo, en el método según el primer aspecto. Las aplicaciones adecuadas, que incluyen usos/objetivos, enfermedades y trastornos que pueden analizarse empleando dicha composición y, en consecuencia, los usos adecuados de dicha composición se describieron en detalle anteriormente y se indican en la anterior descripción. La composición es particularmente adecuada para su uso en los métodos, aplicaciones y usos descritos anteriormente. Según una realización, la composición no comprende un azúcar simple. Según una realización, la composición no comprende un azúcar reductor. Preferiblemente, la composición es un semilíquido, es similar a un gel o es una composición sólida. Preferiblemente, es una composición secada. Según una realización, la composición es una composición secada por pulverización.

De nuevo se vuelven a describir realizaciones ventajosas no limitantes.

El azúcar no reductor puede tener las características descritas anteriormente junto con el método según el primer aspecto y se indican en la anterior descripción, las cuales también se aplican en este punto. Tal como se describió anteriormente, el azúcar no reductor no se emplea como estabilizante para el antígeno, sino que se emplea para aumentar el nivel de respuesta. Tal como se muestra en los ejemplos, los azúcares no reductores, tales como trehalosa, manitol, sacarosa y rafinosa, aumentan los niveles de respuesta. Según una realización, el azúcar no reductor es un disacárido no reductor. El disacárido no reductor puede seleccionarse de trehalosa y sacarosa. La concentración del azúcar no reductor en la composición según el segundo aspecto es, según una realización, de tal forma que cuando dicha composición se pone en contacto con la cantidad prevista de muestra, la composición de incubación resultante comprende el azúcar no reductor en una concentración que es de al menos 1,5 mg/ml, preferiblemente de al menos 2 mg/ml. Los intervalos adecuados para la concentración del azúcar no reductor en la composición de incubación también se describieron anteriormente junto con el método según el primer aspecto y se indican en la anterior descripción. Los materiales de muestra adecuados y preferidos también se describieron anteriormente junto con el método según el primer aspecto y se indican en la anterior descripción. Según una realización, la composición tiene una o más de las siguientes características:

- i) la muestra se obtiene de un sujeto humano;
- ii) la muestra se obtiene de un sujeto humano que está inmunosuprimido o es inmunodeficiente;
- 35 iii) la muestra comprende células inmunológicas seleccionadas del grupo que consiste en células NK, células T, células B, células dendríticas, macrófagos y monocitos; y/o
- iv) la muestra es sangre completa.

Según una realización, el antígeno comprendido en la composición se selecciona del grupo que consiste en péptidos, proteínas, que incluyen glicoproteínas, fosfoproteínas y fosfolipoproteínas, carbohidratos, fosfolípidos y fragmentos de los anteriores, y preferiblemente es proporcionado por uno o más péptidos.

Según una realización, la composición comprende dos o más antígenos diferentes.

Según una realización, la composición comprende uno o más péptidos como antígenos, en la que dichos uno o más péptidos tienen una longitud seleccionada de 5 a 100 aminoácidos, o de 7 a 50 aminoácidos. Según una realización ventajosa, la composición comprende como antígeno uno o más péptidos que son reconocidos por una célula T citotóxica CD8⁺. Preferiblemente, en esta realización, el antígeno es proporcionado por uno o más péptidos que tienen una longitud menor que 15 aminoácidos, preferiblemente que tienen una longitud seleccionada de 7-14 aminoácidos. Los detalles de los respectivos péptidos se describieron anteriormente junto con el método según el primer aspecto y se indican en la anterior descripción.

Según una realización, la composición comprende un antígeno que es proporcionado por al menos dos conjuntos de péptidos, comprendiendo el primer conjunto al menos un péptido con una longitud de aproximadamente 7 a 14 aminoácidos, y un segundo conjunto que comprende al menos un péptido de 15 restos aminoácidos o más, en el que dichos péptidos incluyen todo o parte de un antígeno de proteína. Los detalles de los respectivos conjuntos de péptidos se describieron anteriormente junto con el método según el primer aspecto y se indican en la anterior descripción.

Según una realización ventajosa, la composición comprende un antígeno que es proporcionado por uno o más péptidos sintéticos. Los detalles del péptido o péptidos se describieron anteriormente y se indican en la anterior descripción.

5 Según una realización, la composición comprende un antígeno asociado o que es representativo de una enfermedad o un trastorno para el cual se va a ensayar la respuesta inmunológica mediada por células.

10 Según una realización ventajosa, el antígeno comprendido en la composición es un antígeno específico de enfermedad, en particular un antígeno específico de patógeno. Por ejemplo, el antígeno puede derivarse y, por tanto, presentar reactividad cruzada con un antígeno procedente de un patógeno asociado con un trastorno de enfermedad o es un antígeno asociado a tumor asociado con un cáncer. Tal como se describió anteriormente, el patógeno puede ser una bacteria, un virus, un parásito, una levadura o un hongo. A continuación se describirán ejemplos no limitantes. Por ejemplo, la bacteria puede seleccionarse de microorganismos Gram positivos y Gram negativos, en particular especies de *Mycobacterium*, tales como *Mycobacterium tuberculosis*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Streptococcus*, *Escherichia coli*, especies de *Salmonella*, especies de *Clostridium*, especies de *Shigella*, especies de *Proteus*, especies de *Bacillus*, especies de *Hemophilus* y especies de *Borrelia*. El virus puede seleccionarse del virus de la hepatitis, tal como el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C, herpes virus, virus CMV y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El parásito puede seleccionarse de especies de *Plasmodium*, tiña y parásitos hepáticos.

20 Según una realización, la composición comprende un antígeno que procede o es específico de un virus, tal como citomegalovirus (CMV). Preferiblemente, dicho antígeno es proporcionado por uno o más péptidos que tienen una longitud de 7 a 14 restos aminoácidos, de 7 a 13 restos aminoácidos, o de 8 a 12 restos aminoácidos. Tal como se describió anteriormente, dichos uno o más péptidos pueden ser péptidos sintéticos.

La composición puede estar comprendida en un recipiente de recogida de muestras y en la presente se describen realizaciones adecuadas y ventajosas de dicho recipiente, tal como un recipiente de recogida de sangre al vacío y se indican en la respectiva descripción.

25 La presente invención también proporciona una composición de incubación, que comprende al menos un antígeno aislado, al menos un azúcar no reductor, células inmunológicas capaces de producir moléculas efectoras inmunológicas tras la estimulación con un antígeno, preferiblemente linfocitos T, y opcionalmente al menos un anticoagulante. Preferiblemente, la composición de incubación se prepara a partir de una muestra de sangre completa y, por tanto, la comprende. Según una realización, la composición de incubación se prepara poniendo en contacto una composición según el segundo aspecto, con una muestra. Los materiales de muestra adecuados y preferidos se describieron anteriormente junto con el método según el primer aspecto y se indican en la anterior descripción. Según una realización, la muestra tiene una o más de las siguientes características:

i) la muestra se obtiene de un sujeto humano;

ii) la muestra se obtiene de un sujeto humano que está inmunosuprimido o es inmunodeficiente;

35 iii) la muestra comprende células inmunológicas seleccionadas del grupo que consiste en células NK, células T, células B, células dendríticas, macrófagos y monocitos; y/o

iv) la muestra es sangre completa.

40 Preferiblemente, la composición de incubación se obtiene poniendo en contacto una composición según el segundo aspecto con una muestra de sangre completa obtenida de un sujeto, preferiblemente obtenida de un ser humano. Los detalles con respecto a la composición según el segundo aspecto, la composición de incubación, su preparación, los antígenos, azúcares no reductores y anticoagulantes adecuados se describieron anteriormente junto con el método según la presente invención y la composición según el segundo aspecto y se indican en la anterior descripción. El anticoagulante es preferiblemente heparina. Según una realización, la composición de incubación comprende el azúcar no reductor en una concentración de al menos 1,5 mg/ml, preferiblemente de al menos 2 mg/ml. Los intervalos adecuados para la concentración del azúcar no reductor en la composición de incubación también se describieron anteriormente junto con el método según el primer aspecto y se indican en la anterior descripción. Según una realización, el azúcar no reductor se selecciona de trehalosa, manitol, sacarosa y rafinosa. Tal como se describió anteriormente, según una realización ventajosa, el azúcar no reductor es un disacárido no reductor, preferiblemente seleccionado de trehalosa y sacarosa.

50 También se describe un recipiente de recogida de muestras, en particular un tubo de recogida de muestras, que comprende una respectiva composición que comprende:

a) al menos un antígeno aislado;

b) al menos un azúcar no reductor;

c) opcionalmente al menos un anticoagulante.

La composición comprendida en el recipiente de recogida de muestras es preferiblemente la composición según el segundo aspecto. Los detalles con respecto a la composición, los antígenos, azúcares no reductores y anticoagulantes adecuados se describieron anteriormente y se indican en la anterior descripción. Dicho recipiente de recogida de muestras puede utilizarse, por ejemplo, en el método según el primer aspecto. Las aplicaciones adecuadas, que incluyen usos/objetivos, enfermedades y trastornos que pueden analizarse empleando dicho recipiente de recogida de muestras se describieron en detalle anteriormente y se indican en la anterior descripción. El recipiente de recogida de muestras según el tercer aspecto es adecuado, en particular, para su uso en los métodos, aplicaciones y usos descritos anteriormente. Preferiblemente, la composición se pulveriza sobre el interior del recipiente que preferiblemente es un tubo de recogida de sangre al vacío. Mediante el uso de dichos recipientes de recogida listos para usar en el método de la presente invención se optimizan y se estandarizan las condiciones del método y se simplifica la manipulación.

El método según la invención se realiza preferiblemente empleando un kit que proporciona los materiales necesarios para ejecutar las etapas del método. Este kit preferiblemente comprende un material estandarizado que asegura que el método se realice bajo condiciones optimizadas, asegurando con ello que los resultados obtenidos de diferentes muestras o pacientes o por diferentes médicos puedan compararse entre sí. Por tanto, en un cuarto aspecto, la presente descripción también proporciona un kit para medir la actividad de respuesta inmunológica mediada por células en un sujeto, que comprende al menos un antígeno, al menos un azúcar no reductor, al menos un recipiente de recogida de muestras y al menos un medio de detección para detectar al menos una molécula efectora inmunológica.

La reivindicación 17 define un kit para medir la actividad de respuesta inmunológica mediada por células en un sujeto, que comprende al menos un antígeno de péptido que tiene una longitud seleccionada de 5 a 50 aminoácidos, al menos un azúcar no reductor capaz de aumentar la respuesta de interferón-gamma de las células inmunológicas que responden al antígeno, heparina, al menos un recipiente de recogida de muestras y al menos un medio de detección para el interferón-gamma.

Preferiblemente, el antígeno y el azúcar no reductor se proporcionan en forma de una única composición. Para este fin, puede usarse la composición según el segundo aspecto y los detalles de dicha composición se indican en la anterior descripción. Los detalles con respecto a la composición, el antígeno y el azúcar no reductor también se describieron anteriormente junto con el método y la composición según la presente invención y se indican en la anterior descripción. Según una realización, el kit comprende un recipiente de recogida de muestras, tal como un tubo de recogida de sangre, que comprende la composición que comprende el antígeno y el azúcar no reductor. Preferiblemente, la composición comprende además un anticoagulante, tal como heparina. Tal como se describió, la composición comprendida en el recipiente de recogida de muestras puede ser la composición según el segundo aspecto. Preferiblemente, el medio de detección es un reactivo de inmunodetección, tal como un anticuerpo marcado. Sin embargo, para ensayos que se basan en la detección del nivel de expresión del ARNm, el medio de detección puede ser proporcionado por cebadores y/o sondas específicos para la molécula efectora inmunológica que se va a detectar. Los ensayos y medios de detección adecuados son conocidos por los expertos en la técnica y también se describieron anteriormente.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un azúcar no reductor en un ensayo inmunológico para medir la actividad de respuesta mediada por células, en el que la adición del azúcar no reductor durante la incubación de la muestra con el antígeno aumenta la liberación de una molécula efectora inmunológica desde las células inmunológicas que responden al antígeno ensayado en dicho ensayo.

La reivindicación 19 define el uso de un azúcar no reductor en un ensayo inmunológico para medir la actividad de respuesta mediada por células contra un antígeno de péptido que tiene una longitud seleccionada de 5 a 50 aminoácidos, preferiblemente de 7 a 50 aminoácidos, en el que la adición del azúcar no reductor durante la incubación de la muestra con el antígeno aumenta la liberación de interferón-gamma desde las células inmunológicas que responden al antígeno de péptido ensayado en dicho ensayo, y en el que, preferiblemente, el azúcar no reductor tiene una o más de las siguientes características:

- i) el azúcar no reductor es un disacárido;
- ii) el azúcar no reductor se selecciona de trehalosa y sacarosa;
- 50 iii) el azúcar no reductor se selecciona de trehalosa, manitol, sacarosa y rafinosa;
- iv) el azúcar no reductor es trehalosa;
- v) el azúcar no reductor se emplea en una concentración de al menos 1 mg/ml, preferiblemente 2 mg/ml en la composición de incubación que comprende la muestra que se va a ensayar y el antígeno;
- vi) el azúcar no reductor se proporciona en forma de una composición que comprende además el antígeno que se va a ensayar y, opcionalmente, un anticoagulante.

Los detalles referentes al azúcar no reductor, las concentraciones preferidas, el ensayo inmunológico y sus

aplicaciones en el campo médico, los antígenos adecuados y preferidos, las moléculas efectoras inmunológicas y las células inmunológicas se describieron anteriormente junto con el método según la presente invención y se indican en la anterior descripción. El azúcar no reductor puede tener una o más de las siguientes características:

- i) el azúcar no reductor es un disacárido;
 - 5 ii) el azúcar no reductor se selecciona de trehalosa y sacarosa;
 - iii) el azúcar no reductor se emplea en una concentración de al menos 1 mg/ml, preferiblemente 2 mg/ml en la composición de incubación que comprende la muestra que se va a ensayar y el antígeno; y/o
 - iv) el azúcar no reductor se proporciona en forma de una composición que comprende además el antígeno que se va a ensayar y, opcionalmente, un anticoagulante.
- 10 Según una realización, el azúcar no reductor se selecciona de trehalosa, manitol, sacarosa y rafinosa.

El uso de un azúcar no reductor, según se describe en la presente, por ejemplo, trehalosa, en un ensayo para determinar o controlar la inmunidad mediada por células tiene ventajas significativas. Tal como se describió anteriormente, preferiblemente el azúcar no reductor se proporciona junto con el antígeno en forma de una única composición que se pone en contacto con la muestra. Según una realización, no se añade un azúcar reductor para la incubación y/o ni está comprendido en la composición que comprende el azúcar no reductor y el antígeno. Tal como se describió anteriormente, el azúcar no reductor no se emplea como estabilizante para el antígeno. Según una realización ventajosa, el antígeno es proporcionado por uno o más péptidos, preferiblemente péptidos sintéticos, que son reconocidos por una célula T citotóxica CD8⁺. Preferiblemente, en esta realización, el antígeno es proporcionado por uno o más péptidos, preferiblemente péptidos sintéticos, que tienen una longitud menor que 15 aminoácidos, preferiblemente que tienen una longitud seleccionada de 7-14 aminoácidos.

Según otro aspecto, la presente descripción se refiere al uso de la composición según el segundo aspecto, a un recipiente de recogida de muestras según el tercer aspecto y/o a un kit según el cuarto aspecto en un ensayo para medir la actividad de respuesta mediada por células. Los detalles con respecto a los usos y aplicaciones adecuados y preferidos se describieron anteriormente y se indican en la anterior descripción. Según una realización, el ensayo es para controlar o determinar la presencia, la ausencia, el nivel o el estadio de una enfermedad o un trastorno seleccionado del grupo que consiste en una infección por un agente patógeno, una enfermedad autoinmunitaria, un cáncer, un trastorno inflamatorio, la exposición a un agente tóxico, la respuesta a un agente terapéutico, una inmunodeficiencia y una inmunosupresión. Según una realización, el ensayo es para detectar o controlar una enfermedad, una infección y/o la respuesta a una terapia, en particular una inmunoterapia o una terapia con agentes inmunosupresores. Según una realización, la composición según el segundo aspecto, un recipiente de recogida de muestras según el tercer aspecto y/o un kit según el cuarto aspecto se emplea en el método según el primer aspecto que se describe en detalle anteriormente y en las reivindicaciones.

Los intervalos numéricos descritos en la presente incluyen los números que definen el intervalo. Los encabezados proporcionados en la presente no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de esta invención, y pueden leerse como referencia a la memoria descriptiva como un todo. Según una realización, la materia descrita en la presente, que comprende ciertas etapas en el caso de los métodos o que comprende ciertos ingredientes en el caso, por ejemplo, de composiciones, disoluciones y/o mezclas, se refiere a la materia que consiste en las respectivas etapas o ingredientes. Se prefiere seleccionar y combinar las realizaciones preferidas descritas en la presente, y la materia específica que surge de una respectiva combinación de las realizaciones preferidas también pertenece a la presente descripción.

La invención se ilustrará con más detalle a continuación mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Efectos de la trehalosa sobre la sensibilidad del ensayo del virus de Epstein-Barr

Se realizaron investigaciones empleando la tecnología de QuantiFERON para medir las respuestas al modelo de antígeno EBNA-1 del virus de Epstein-Barr para evaluar los aumentos en la sensibilidad del ensayo inducidos por la adición de azúcares no reductores a la mezcla de incubación. Brevemente, se añadieron péptidos de EBNA-1 a un tubo de recogida de sangre más/menos 3 concentraciones de una disolución de trehalosa (0,5, 1,0 o 2,0 mg/ml de trehalosa). Se ejecutó el ensayo QuantiFERON que mide las respuestas inmunológicas celulares anti-EBV según las instrucciones del fabricante. Se determinó la respuesta de IFN-gamma y se comparó dependiendo de la concentración de trehalosa. Se observó un aumento en la respuesta de IFN-gamma según aumentaba la concentración de trehalosa. Una concentración de 2 mg/ml de trehalosa proporcionó los mejores resultados en este ensayo.

Estos estudios demuestran que la adición de un azúcar no reductor, tal como trehalosa, al ensayo de sangre completa produjo un aumento significativo en la respuesta de IFN-gamma en un ensayo de respuesta inmunológica mediada por células. Debido al aumento en la respuesta de IFN-gamma que es inducido por la adición del azúcar no

reductor, la sensibilidad del ensayo se potencia.

Ejemplo 2: Estabilidad durante la conservación de un ensayo de la técnica anterior

En este ejemplo se realizó un ensayo de respuesta inmunológica mediada por células contra CMV y se analizó la estabilidad durante la conservación de los componentes del ensayo. Como antígeno se emplearon péptidos sintéticos con una longitud de 8-12 aminoácidos procedentes de antígenos asociados con citomegalovirus. Los péptidos sintéticos asociados con CMV se formularon en una disolución que contenía un azúcar simple (glucosa) y se pulverizaron sobre el interior de un tubo de recogida de muestras que después se seca. Por tanto, el antígeno y el azúcar simple estaban comprendidos en una única composición. El ensayo de estabilidad de dicha composición comprendida en el tubo de recogida de sangre indicó que la actividad del ensayo disminuía a lo largo del tiempo de conservación a temperatura ambiente. Además, la actividad del ensayo del dispositivo para CMV se pierde cuando el dispositivo de recogida de sangre que comprende la composición secada por pulverización que comprende el antígeno y glucosa se conserva a 55 °C durante un periodo mayor que 3 semanas (21 días). Por tanto, las respectivas composiciones y, por consiguiente, los tubos de recogida que comprenden las respectivas composiciones no son adecuados para su uso como componentes de un kit listo para usar debido a la falta de estabilidad durante la conservación. La eliminación de la glucosa de la composición restableció la estabilidad y la función del ensayo. Por tanto, no es factible incluir el azúcar simple junto con el antígeno en una composición. En su lugar, para aumentar la sensibilidad del ensayo, el azúcar simple debe añadirse por separado a la muestra durante la preparación de la composición de incubación.

Por contraste, las composiciones que comprenden el antígeno y un azúcar no reductor según se divulgan en la presente pueden mantener la mayor sensibilidad del ensayo también a lo largo de periodos de conservación largos.

Estos resultados también fueron confirmados por otros experimentos. Se conservaron tubos de CMV que contenían o no glucosa durante tres semanas a 4 °C, 22 °C, 37 °C y 55 °C y después se ensayaron con muestras de sangre procedentes de 4 donantes reactivos y un donante no reactivo. La tabla 1 muestra los datos promedio obtenidos con los donantes reactivos. Tal como indican las temperaturas, los tubos de CMV que contenían glucosa son menos reactivos que los tubos conservados a 4 °C o 22 °C y muestran una marcada disminución en las respuestas relativas a la formulación líquida (patrón de referencia) empleada para preparar los tubos de CMV. Por contraste, los tubos que carecen de glucosa no mostraron una respectiva pérdida en la reactividad.

Tabla 1 - Efecto de la glucosa durante la conservación Se muestra la diferencia en número de veces con respecto a la retención (promedio IU/ml)

	55 °C	37 °C	22 °C	4 °C
Tubos de CMV con glucosa	0,58	0,75	1,48	1,34
Tubos de CMV sin glucosa	0,97	0,91	1,01	1,21

Ejemplo 3: Efecto de la adición de trehalosa sobre la respuesta de IFN-gamma en un tubo de QFN-CMV

QuantIFERON (QFN) CMV es un ensayo registrado en la CE que controla la memoria inmunológica de células T dirigida contra antígenos derivados de *Cytomegalovirus*. Los tubos de sangre de QFN-CMV contienen péptidos diseñados para activar específicamente células T CD8+ para producir interferón gamma (IFN-gamma). Estos tubos solo contienen péptido y heparina, sin adición de ninguna molécula de azúcar.

Este experimento está dirigido a investigar el efecto sobre la respuesta de IFN-gamma cuando se añade el azúcar no reductor trehalosa a los tubos de QFN-CMV. Se añadieron 0, 1, 5 o 10 mg/ml de una disolución de trehalosa (en agua) a tubos de recogida de sangre de QFN-CMV. Después se añadió 1 ml de sangre procedente de 17 donantes sanos con una respuesta de células T anti-CMV conocida a cada uno de los cuatro tubos y, además, se ensayaron como controles un tubo nulo y un tubo con mitógeno. Después se realizó el ensayo de QFN según el inserto del envase. A todos los valores se les restó el valor nulo. Los niveles de IFN-gamma en IU/ml se normalizaron contra el respectivo QFN-CMV + 0 mg/ml de trehalosa (control sin tratar) para generar una unidad de "cambio en número de veces" para controlar la variante interdonante en magnitudes de respuesta. Los donantes sanos sin respuesta inmunológica anti-CMV detectable se incluyeron como control frente a la inducción de IFN-gamma no específica por la trehalosa.

La adición de trehalosa produjo un aumento dependiente de la concentración en el nivel promedio de IFN-gamma (expresado como cambio en número de veces de IFN-gamma frente al correspondiente control sin tratar). Se observó un aumento significativo en el efecto con la adición de 5 y 0 mg/ml de trehalosa (ensayo de Friedman con ensayo de comparación múltiple de Dunn). Los resultados se muestran en la figura 1. No se observó un aumento significativo en el nivel de fondo del IFN-gamma en los donantes de control negativo de CMV (los datos no se muestran).

La adición de trehalosa a un ensayo de QFN aumenta significativamente el nivel de IFN-gamma producido en respuesta al antígeno o antígenos específicos contenidos en el tubo de recogida de sangre sin aumentar, de modo no específico, el nivel de fondo de IFN-gamma.

Ejemplo 4: Efecto de la adición de trehalosa sobre la respuesta de IFN-gamma en un tubo de QFN-TB

- 5 Para confirmar la observación de que la adición del azúcar no reductor trehalosa a un ensayo que evalúa la inmunidad celular específica de péptido, tal como el ensayo QuantiFERON (QFN), potencia el resultado cuantitativo del ensayo, se fabricaron tubos de QFN con la adición de un azúcar no reductor. Los tubos de recogida de sangre de QFN se fabricaron para que contuviesen péptidos sintéticos de los antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ESAT-6 y CFP-10 sin la adición de ningún azúcar o con la adición del azúcar no reductor trehalosa.
- 10 Se ensayó sangre completa procedente de 20 sujetos con pruebas de infección por MTB, confirmada empleando el ensayo QuantiFERON Gold In Tube, utilizando la tecnología de la plataforma QuantiFERON establecida, pero usando los tubos de antígeno de QFN TB modificados descritos anteriormente que fueron fabricados sin un azúcar no reductor (sin azúcar) o con un azúcar no reductor (trehalosa). El ensayo se realizó según el inserto del envase de QFT Gold que es un ensayo establecido. En este análisis clínico apareado, la inclusión del azúcar no reductor
- 15 trehalosa en el tubo de antígeno de TB potenció significativamente la respuesta cuantitativa del ensayo ($P = 0,0005$), tal como se muestra en la figura 2. Los valores de los tubos (eje de ordenadas) se muestran en valores logarítmicos transformados de IFN-gamma IU/ml (habiendo restado los valores de los tubos nulos). Se realizó un ensayo de la t de una cola apareado para mostrar la significancia estadística entre las dos cohortes. Los resultados demuestran claramente que la adición de trehalosa aumenta la respuesta de interferón gamma, tal como se demuestra en los
- 20 sujetos con infección por TB.

Ejemplo 5: La adición de diferentes azúcares no reductores aumenta la respuesta cuantitativa de INF-gamma

- El efecto de potenciación observado también se demostró con otros azúcares no reductores. Para este experimento se añadieron cuatro azúcares no reductores diferentes a los tubos de antígeno de QFN CMV y a un correspondiente tubo nulo. Para alcanzar una concentración final en sangre de 2 mg/ml, se añadió una correspondiente disolución de
- 25 sacarosa, trehalosa, manitol y rafinosa en PBS a la sangre completa obtenida de 5 donantes. Por tanto, se realizó un ensayo de QFN con sangre procedente de 5 donantes empleando tubos de QFN sin (N/S) o con la adición de un azúcar no reductor (sacarosa, trehalosa, manitol o rafinosa). El ensayo se realizó según el inserto del envase de QFN que es un ensayo establecido. Los resultados se muestran en la figura 3. El eje de abscisas (véase la figura 3) indica las condiciones ensayadas. Se restó el fondo (valor de los tubos nulos con/sin la adición del respectivo
- 30 azúcar) del correspondiente tubo de CMV y se calculó el porcentaje de aumento en el valor de IFN-gamma (IU/ml) frente al tubo sin aditivo (eje de ordenadas). Los resultados demuestran que se observa una respuesta aumentada a los antígenos de CMV, según se mide mediante el valor cuantitativo de IFN-gamma (IU/ml), con los cuatro azúcares no reductores. Así, todos los azúcares no reductores ensayados tenían un efecto beneficioso sobre la respuesta de INF-gamma. Se observó el mayor aumento con trehalosa, seguido de manitol, sacarosa y rafinosa.

35

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para medir una actividad de respuesta inmunológica mediada por células, comprendiendo dicho método:
- 5 (a) proporcionar una composición de incubación poniendo en contacto una muestra que comprende células inmunológicas capaces de producir moléculas efectoras inmunológicas tras la estimulación con un antígeno de péptido, con al menos un antígeno de péptido que tiene una longitud seleccionada de 5 a 50 aminoácidos, y con al menos un azúcar no reductor capaz de aumentar la respuesta de interferón-gamma de las células inmunológicas que responden al antígeno; y
- 10 (b) detectar la presencia o el nivel de al menos una molécula efectora inmunológica, en el que la detección de la presencia o del nivel de al menos una molécula efectora inmunológica comprende detectar la presencia o el nivel del interferón-gamma (INF-gamma).
- 2.- El método según la reivindicación 1, en el que el azúcar no reductor es un disacárido no reductor, preferiblemente seleccionado de trehalosa y sacarosa.
- 3.- El método según la reivindicación 1 o 2, en el que la concentración del azúcar no reductor en la composición de incubación es de al menos 1,5 mg/ml, preferiblemente de al menos 2 mg/ml.
- 15 4.- El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 3, en el que, en la etapa (a), la muestra se pone en contacto con una composición que comprende el antígeno y el azúcar no reductor, y en el que, preferiblemente, dicha composición está comprendida en un recipiente de recogida de muestras.
- 20 5.- El método según la reivindicación 4, en el que la composición comprende además un anticoagulante, preferiblemente heparina, y en el que la muestra es una muestra de sangre completa.
- 6.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra tiene una o más de las siguientes características:
- i) la muestra se obtiene de un sujeto humano;
- ii) la muestra se obtiene de un sujeto humano que está inmunosuprimido o es inmunodeficiente;
- 25 iii) la muestra comprende células inmunológicas seleccionadas del grupo que consiste en células NK, células T, células B, células dendríticas, macrófagos y monocitos; y/o
- iv) la muestra es sangre completa.
- 7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el antígeno tiene una o más de las siguientes características:
- 30 i) se emplean uno o más péptidos como antígeno, en el que dichos uno o más péptidos tienen una longitud seleccionada de 7 a 50 aminoácidos;
- ii) el antígeno es proporcionado por uno o más péptidos sintéticos;
- iii) el antígeno es proporcionado por al menos dos conjuntos de péptidos, comprendiendo el primer conjunto al menos un péptido con una longitud de aproximadamente 7 a 14 aminoácidos, y un segundo conjunto que comprende al menos un péptido de 15 restos aminoácidos o más, en el que dichos péptidos incluyen todo o parte de un antígeno de proteína;
- 35 iv) el antígeno es proporcionado por uno o más péptidos que son reconocidos por una célula T citotóxica CD8⁺; y/o
- v) el antígeno es proporcionado por uno o más péptidos que son reconocidos por una célula T citotóxica CD8⁺, y en el que dichos uno o más péptidos tienen una longitud menor que 15 aminoácidos, preferiblemente tienen una longitud seleccionada de 7-14 aminoácidos.
- 40 8.- El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 7, en el que, en la etapa (a), se emplean dos o más antígenos diferentes y/o en el que, en la etapa (b), se detectan dos o más moléculas efectoras diferentes.
- 9.- El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el antígeno es un antígeno específico de enfermedad, en particular un antígeno específico de patógeno.
- 45 10.- El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el antígeno tiene una o más de las siguientes características:
- i) el antígeno está asociado o es representativo de una enfermedad o un trastorno para el cual se va a ensayar la respuesta inmunológica mediada por células;

- ii) el antígeno se deriva y, por tanto, presenta reactividad cruzada con un antígeno procedente de un patógeno asociado con un trastorno de enfermedad o es un antígeno asociado a tumor asociado con un cáncer;
- iii) el antígeno es un antígeno específico de patógeno, y en el que el patógeno es una bacteria, un virus, un parásito, una levadura o un hongo;
- 5 iv) el antígeno es un antígeno específico de patógeno, concretamente un antígeno específico de bacteria, y en el que la bacteria se selecciona de microorganismos Gram positivos y Gram negativos, en particular especies de *Mycobacterium*, tales como *Mycobacterium tuberculosis*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Streptococcus*, *Escherichia coli*, especies de *Salmonella*, especies de *Clostridium*, especies de *Shigella*, especies de *Proteus*, especies de *Bacillus*, especies de *Hemophilus* y especies de *Borrelia*;
- 10 v) el antígeno es un antígeno específico de patógeno, concretamente un antígeno específico de virus, y en el que el virus se selecciona del virus de la hepatitis, tal como el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C, herpes virus, virus CMV y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); y/o
- vi) el antígeno procede o es específico de un virus, preferiblemente citomegalovirus (CMV), y es proporcionado por uno o más péptidos que tienen una longitud de 7 a 14 restos aminoácidos, de 7 a 13 restos aminoácidos, o de 8 a 12 restos aminoácidos.
- 15 11.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para controlar o determinar la presencia, la ausencia, el nivel o el estadio de una enfermedad o un trastorno seleccionado del grupo que consiste en una infección por un agente patógeno, una enfermedad autoinmunitaria, un cáncer, un trastorno inflamatorio, la exposición a un agente tóxico, la respuesta a un agente terapéutico, una inmunodeficiencia y una inmunosupresión.
- 20 12.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende:
- (a) proporcionar una composición de incubación poniendo en contacto una muestra de sangre completa obtenida de un sujeto humano con una composición que comprende al menos un antígeno de péptido que tiene una longitud seleccionada de 5 a 50 aminoácidos, y al menos un disacárido no reductor, preferiblemente trehalosa o sacarosa, e incubando la composición de incubación durante al menos 2 horas; y
- 25 (b) medir la presencia o el nivel de IFN-gamma liberado debido a la estimulación con el antígeno;
- en el que la presencia o la cantidad de IFN-gamma detectado es indicativa del nivel de capacidad de respuesta inmunológica mediada por células del sujeto humano.
- 13.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el azúcar no reductor se selecciona de trehalosa, manitol, sacarosa y rafinosa, y en el que, preferiblemente, el azúcar no reductor es trehalosa.
- 30 14.- Una composición para inducir una respuesta inmunológica mediada por células en una muestra, que comprende:
- a) al menos un antígeno de péptido que tiene una longitud seleccionada de 5 a 50 aminoácidos, en la que el antígeno es un antígeno específico de enfermedad;
- b) al menos un azúcar no reductor capaz de aumentar la respuesta de interferón-gamma de las células
- 35 inmunológicas que responden al antígeno; y
- c) al menos un anticoagulante, en la que el anticoagulante es heparina.
- 15.- La composición según la reivindicación 14, que tiene una o más de las siguientes características:
- i) el azúcar no reductor es un disacárido no reductor, preferiblemente seleccionado de trehalosa y sacarosa;
- ii) el azúcar no reductor se selecciona de trehalosa, manitol, sacarosa y rafinosa;
- 40 iii) el azúcar no reductor es trehalosa;
- iv) el antígeno tiene una o más de las características definidas en una o más de las reivindicaciones 7 a 10;
- v) el antígeno es proporcionado por uno o más péptidos, preferiblemente péptidos sintéticos, que tienen una longitud menor que 15 aminoácidos, preferiblemente que tienen una longitud seleccionada de 7-14 aminoácidos; y/o
- vi) la composición es una composición secada por pulverización.
- 45 16.- Un recipiente de recogida de muestras que comprende la composición según la reivindicación 14 o 15.
- 17.- Un kit para medir la actividad de respuesta inmunológica mediada por células en un sujeto, que comprende al menos un antígeno de péptido que tiene una longitud seleccionada de 5 a 50 aminoácidos, al menos un azúcar no

reductor capaz de aumentar la respuesta de interferón-gamma de las células inmunológicas que responden al antígeno, heparina, al menos un recipiente de recogida de muestras y al menos un medio de detección para el interferón-gamma.

5 18.- El kit según la reivindicación 17, en el que el recipiente de recogida de muestras tiene las características del recipiente de recogida de muestras según la reivindicación 16.

10 19.- El uso de un azúcar no reductor en un ensayo inmunológico para medir la actividad de respuesta mediada por células contra un antígeno de péptido que tiene una longitud seleccionada de 5 a 50 aminoácidos, preferiblemente de 7 a 50 aminoácidos, en el que la adición del azúcar no reductor durante la incubación de la muestra con el antígeno aumenta la liberación de interferón-gamma desde las células inmunológicas que responden al antígeno de péptido ensayado en dicho ensayo, y en el que, preferiblemente, el azúcar no reductor tiene una o más de las siguientes características:

i) el azúcar no reductor es un disacárido;

ii) el azúcar no reductor se selecciona de trehalosa y sacarosa;

iii) el azúcar no reductor se selecciona de trehalosa, manitol, sacarosa y rafinosa;

15 iv) el azúcar no reductor es trehalosa;

v) el azúcar no reductor se emplea en una concentración de al menos 1 mg/ml, preferiblemente 2 mg/ml en la composición de incubación que comprende la muestra que se va a ensayar y el antígeno;

vi) el azúcar no reductor se proporciona en forma de una composición que comprende además el antígeno que se va a ensayar y, opcionalmente, un anticoagulante.

20

Efecto de la concentración de trehalosa sobre la respuesta de QFN-CMV (valores normalizados a la respuesta de CMV) [n = 17]

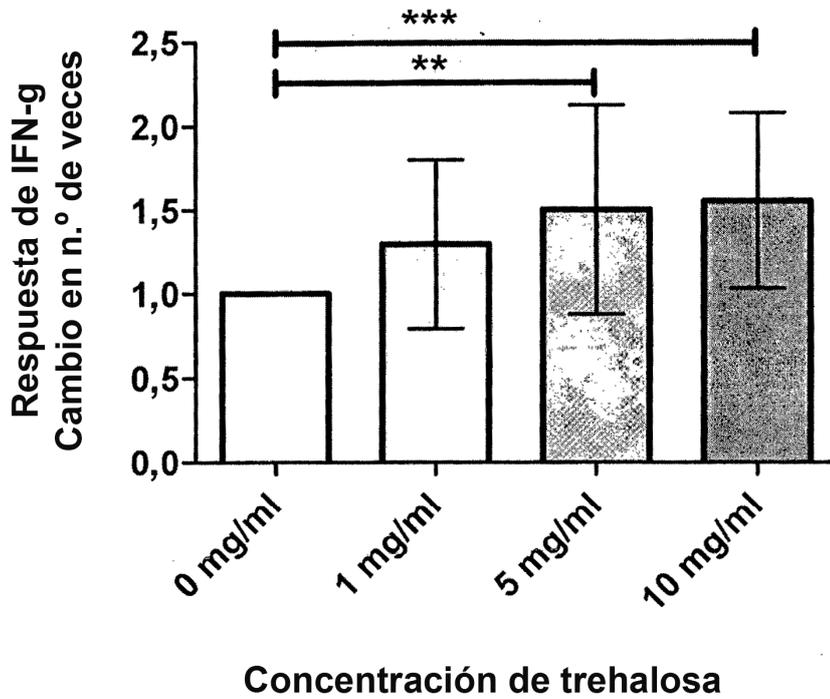


Figura 1

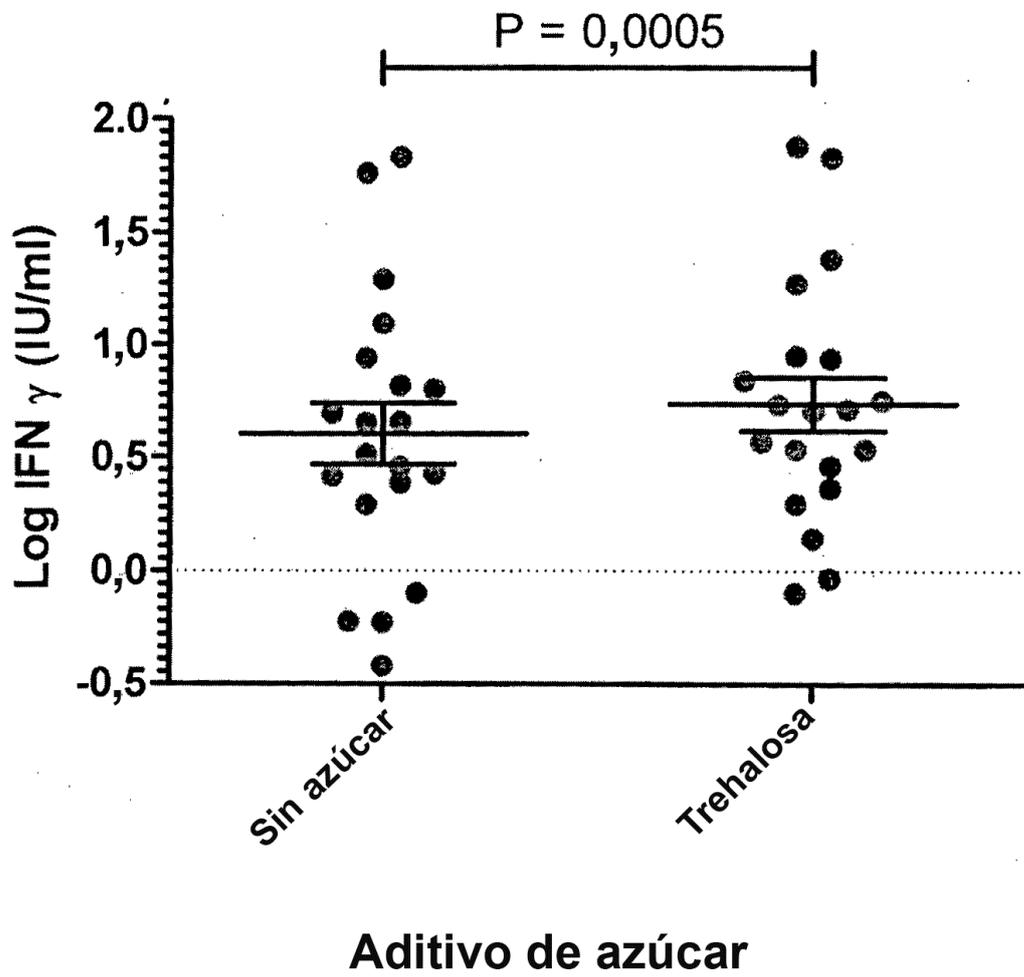
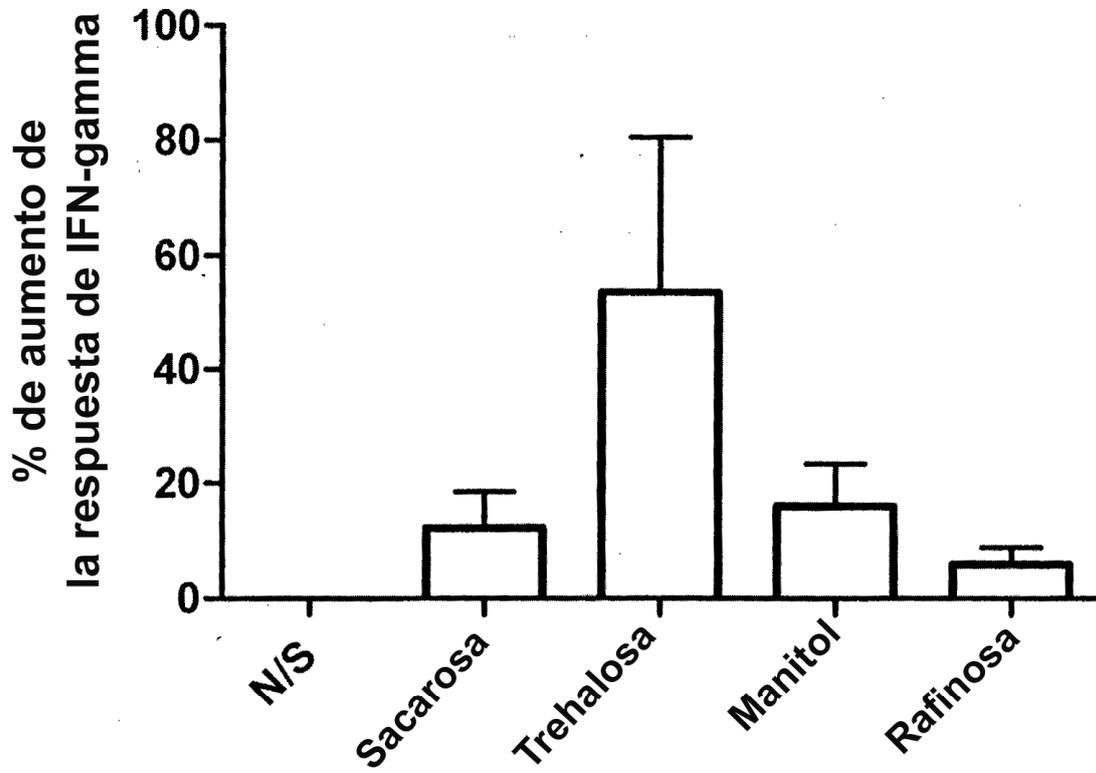


Figura 2



Aditivo de azúcar no reductor

Figura 3