

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 723 352**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2014 PCT/GB2014/052809**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015 WO15040377**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2014 E 14781260 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 3047035**

54 Título: **Biomarcadores para la tuberculosis**

30 Prioridad:

17.09.2013 GB 201316524

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

26.08.2019

73 Titular/es:

**UNITED KINGDOM RESEARCH AND
INNOVATION (100.0%)
Polaris House, North Star Avenue
Swindon SN2 1FL, GB**

72 Inventor/es:

SUTHERLAND, JAYNE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 723 352 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

Biomarcadores para la tuberculosis

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los biomarcadores de enfermedades. En un aspecto, la invención se refiere a métodos para detectar o diagnosticar la tuberculosis en un sujeto usando dichos biomarcadores.

10 Antecedentes de la invención

15 La tuberculosis es un importante problema de salud pública en los países en desarrollo debido al hacinamiento, la infraestructura deficiente y las altas tasas de infección por VIH [1]. Uno de los obstáculos principales para reducir la transmisión de la TB es la falta de ensayos diagnósticos precisos para su uso en clínicas sanitarias de atención primaria, que atienden a la mayoría de los pacientes con TB (60 %) pero no pueden proporcionar un diagnóstico de TB confirmado en el laboratorio [2]. Sin un diagnóstico oportuno y preciso, la transmisión se produce a una tasa de 15 contactos cercanos por año por paciente [3].

20 Los ensayos diagnósticos de TB actuales requieren la detección de las bacterias en muestras de esputo. Sin embargo, estos muestran una variación considerable en sensibilidad y especificidad, en particular para los sujetos infectados por el VIH debido a esputos improductivos o paucibacilares. El ensayo diagnóstico de referencia actual, el cultivo de esputo, lleva mucho tiempo, es caro, es propenso a la contaminación y requiere infraestructura. Los nuevos ensayos de base molecular, tales como el GeneXpert®, proporcionan una detección rápida de la TB y de la resistencia a la rifampicina en laboratorios bien equipados, pero son caros, requieren infraestructura y carecen de 25 sensibilidad en sujetos con frotis negativos (incluyendo niños e infectados por el VIH).

30 Los ensayos rápidos basados en microfluidos (ensayos de flujo lateral) son muy prometedores para el diagnóstico de la TB. Son fáciles de usar, baratos, proporcionan una respuesta en minutos, no requieren equipo especializado y son estables a temperatura ambiente; haciéndolos ideales para su uso en entornos con alta carga de TB y con pocos recursos. Los ensayos de flujo lateral detectan marcadores dentro de una muestra de fluido corporal: siendo la orina y la sangre las más comunes. Hasta la fecha, sin embargo, no se ha desarrollado ningún ensayo de este tipo para la TB debido a la falta de sensibilidad relacionada con los marcadores y/o el tipo de muestra.

35 La baja sensibilidad de los actuales ensayos de liberación de IFN- γ basados en sangre (IGRA, por sus siglas en inglés) [4] puede deberse a la migración de células específicas de TB desde la sangre al pulmón durante la TB activa, puesto que hay presentes niveles significativamente más altos de marcadores inmunitarios del hospedador celulares y solubles en el líquido pleural en comparación con la sangre de los mismos sujetos [5]. El análisis dio como resultado una clasificación correcta del 96 % de la TB u otras enfermedades respiratorias independientemente del estado del VIH [5]. Además, el análisis no requirió estimulación antigénica, con altos niveles de marcadores 40 presentes inmediatamente ex vivo. Los antígenos de Mtb varían considerablemente de acuerdo con la etapa de la infección, lo que sugiere que un ensayo independiente de antígenos aumentaría la especificidad.

45 A pesar de la confianza en la recogida de muestras de esputo para el diagnóstico de TB por microbiología, no se ha evaluado el potencial diagnóstico de la fracción soluble (es decir, biomarcadores del hospedador), como se ha observado en otras enfermedades respiratorias tales como el asma [6], la fibrosis quística [7] y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) [7].

50 Por tanto, todavía existe la necesidad de métodos mejorados para detectar la tuberculosis en los sujetos. En particular, existe la necesidad de un método que sea preciso pero rápido, barato y adecuado para su uso en el punto de atención (es decir, en un entorno que no sea de laboratorio).

55 Arko-Mensah et al. (*Clinical Microbiology and Infection*, 2009, vol. 15, n.º 8; documento XP055154916) describen que el aumento de los niveles de marcadores inmunológicos en el aparato respiratorio, pero no en el suero, se correlaciona con la infección pulmonar activa por micobacterias en ratones.

Handzel et al. (*Allergy and Clinical Immunology*, 2007, vol. 9, páginas 479-483; documento XP008153329) describen el aumento de la producción de citocinas Th1 y Th2 en pacientes con tuberculosis activa.

60 Sutherland et al. (*PLoS One*, 2012, vol. 7, número 1, e30324; documento XP055154918) describen el diagnóstico de tuberculosis pleural mediante análisis inmunológico del derrame pleural.

Versluis et al. (*Allergy*, 2008, vol. 63, páginas 1186-1194; documento XP055154921) describen que la inhalación de alérgenos disminuye la expresión del receptor de adenosina en esputo y sangre de pacientes con asma.

Yang et al. (*Respiratory Research*, 2011, vol. 12, página 142; documento XP021111472) describen la relación entre las propiedades antiinflamatorias del salmeterol/fluticasona y la expresión de linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en la EPOC.

- 5 Cassano et al. (*J Biomed Mater Res Part A*, 2012: 100A: 536-542; documento XP055154977) describen microesferas a base de rifampicina respirables que contienen isoniazida para el tratamiento de la tuberculosis.

Sumario de la invención

10 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. En consecuencia, la presente invención proporciona un método para detectar la tuberculosis en un sujeto, que comprende (a) determinar un nivel de uno o más biomarcadores de proteínas del sistema inmunitario del hospedador en una muestra de esputo obtenida del sujeto, en el que los biomarcadores se seleccionan entre el antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1Ra), la interleucina-10 (IL-10), la interleucina-13 (IL-13), la interleucina-15 (IL-15), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); y (b) comparar los niveles de los biomarcadores en la muestra de esputo con uno o más valores de referencia; en el que una disminución del nivel de IL-1Ra, IL10, IL-13, IL-15, G-CSF y/o VEGF en la muestra de esputo en comparación con el o los valores de referencia y/o un aumento del nivel de FGF en la muestra de esputo en comparación con el valor de referencia, son indicativos de la presencia de tuberculosis en el sujeto.

20 En una realización, los biomarcadores comprenden una o más citocinas seleccionadas entre el antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1Ra), la interleucina-15 (IL-15), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Una disminución del nivel de IL1Ra, IL-15, G-CSF y/o VEGF en comparación con los valores de referencia es indicativa de la presencia de tuberculosis en el sujeto.

25 En otra realización, el biomarcador comprende el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Un aumento del nivel de FGF en comparación con el valor de referencia es indicativo de la presencia de tuberculosis en el sujeto.

30 En otra realización, los biomarcadores comprenden IL-13, FGF e IFN- γ .

En una realización, se sospecha que el sujeto padece una enfermedad pulmonar (o trastorno respiratorio) y el sujeto muestra uno o más síntomas seleccionados entre tos crónica, dolor en el pecho y fiebre.

35 Como se desvela en el presente documento, los niveles de biomarcadores en la muestra de esputo se comparan preferentemente con los niveles de biomarcadores correspondientes (para cada biomarcador particular) en muestras de control. En una realización, las muestras de control pueden incluir sujetos que padecen otras enfermedades pulmonares (o trastornos respiratorios), tales como, por ejemplo, neumonía.

40 En una realización, los niveles de los biomarcadores se determinan mediante un inmunoensayo (por ejemplo, cada biomarcador se detecta usando un anticuerpo o fragmento del mismo). Preferentemente, los niveles de biomarcadores se determinan usando un ensayo ELISA. En una realización, la detección se realiza usando un inmunoensayo de flujo lateral. En otra realización, los niveles de biomarcadores se detectan usando un ensayo de citocinas múltiple, por ejemplo, usando microesferas Luminex™.

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un agente antituberculoso para su uso en el tratamiento de la tuberculosis en un sujeto, en el que la presencia de tuberculosis en el sujeto se ha determinado mediante un método como se ha definido anteriormente.

50 Preferentemente, el agente antituberculoso comprende administrar isoniazida, rifampicina, etambutol y/o pirazinamida al sujeto. En otra realización preferida, el tratamiento para la tuberculosis se administra durante al menos 2 meses, al menos 4 meses o al menos 6 meses.

55 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral para detectar tuberculosis en un sujeto, en el que el dispositivo se usa para determinar el nivel de uno o más biomarcadores de proteínas del sistema inmunitario del hospedador en una muestra de esputo obtenida del sujeto, en el que el dispositivo comprende uno o más reactivos adecuados para detectar uno o más biomarcadores de proteínas del sistema inmunitario del hospedador en una muestra de esputo obtenida del sujeto y en el que los biomarcadores se seleccionan entre IL-1Ra, IL-10, IL-13, IL -15, FGF, GCSF y VEGF.

60 En una realización, el dispositivo comprende uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más de los biomarcadores del sistema inmunitario del hospedador. Preferentemente, los anticuerpos se unen a IL-13, FGF y/o IFN- γ .

65 En una realización, el dispositivo comprende un anticuerpo marcado (por ejemplo, un anticuerpo marcado con un resto marcador detectable, tal como un marcador fluorescente o un radiomarcador) y un anticuerpo inmovilizado (por ejemplo, un anticuerpo que se inmoviliza en una fase sólida), en el que los anticuerpos marcados e inmovilizados se

unen cada uno a un epítopo diferente en el biomarcador, es decir, de manera que los anticuerpos no compitan por la unión al biomarcador. Por tanto, los anticuerpos marcados e inmovilizados son normalmente capaces de unirse simultáneamente al biomarcador.

5 Preferentemente, el anticuerpo inmovilizado se inmoviliza sobre un material portador cromatográfico. El material portador cromatográfico es normalmente un material capilar activo, por ejemplo, que permite la migración del componente fluido de la muestra de esputo.

10 En una realización preferida, el dispositivo es en forma de una varilla o tira reactiva, por ejemplo, una tira reactiva cromatográfica. La puesta en contacto de la muestra con la tira reactiva puede permitir, en una realización, la migración del líquido en la muestra hacia el anticuerpo inmovilizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo marcado se deposita sobre el material portador cromatográfico y, preferentemente, también migra hacia el anticuerpo inmovilizado después de la adición de la muestra a la tira reactiva. En una realización preferida, el anticuerpo marcado y el biomarcador forman un complejo que es capturado por el anticuerpo inmovilizado en una región de ensayo de la tira cromatográfica. La presencia de tuberculosis en el sujeto se indica preferentemente mediante una señal visible (por ejemplo, un cambio de color) en una región de ensayo del dispositivo después de poner en contacto el dispositivo con la muestra de esputo.

20 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Demografía de los pacientes. TB = con tuberculosis; sin TB = con otras enfermedades respiratorias; ESE = ensayo en sangre entera; EPOC = enfermedad pulmonar obstructiva crónica; EAR = infección del aparato respiratorio (indefinida); IIC = intervalo intercuartílico.

25 Figura 2: Niveles de citocinas después de 24 horas de incubación sin estimulación antigénica (control de Nil). Análisis de 20 sujetos TB y 26 sujetos sin TB (otros trastornos respiratorios) para determinar los niveles de citocinas después de 24 horas de incubación. El recuadro indica el intervalo intercuartílico; la línea indica la mediana; las barras indican un intervalo del 5-95 % y los puntos indican valores atípicos. Los datos se analizaron usando el ensayo U de Mann-Whitney para la comparación de sujetos TB y sin TB. Los valores de $P \leq 0,035$ se consideraron significativos y se indican.

35 Figura 3: Niveles de citocinas después de 24 horas de incubación con PPD. Análisis de 20 sujetos TB y 26 sujetos sin TB (otros trastornos respiratorios) para detectar los niveles de citocinas después de 24 horas de incubación con PPD. El recuadro indica el intervalo intercuartílico; la línea indica la mediana; las barras indican un intervalo del 5-95 % y los puntos indican valores atípicos. Los datos se analizaron usando el ensayo U de Mann-Whitney para la comparación de sujetos TB y sin TB. Los valores de $P \leq 0,035$ se consideraron significativos y se indican.

40 Figura 4: Niveles de citocinas en suero y saliva ex vivo. A: Análisis de saliva ex vivo de 20 sujetos TB (gris) y 42 sujetos sin TB (blanco). B: Análisis de suero ex vivo de 25 sujetos TB (gris) y 52 sujetos sin TB (blanco). El recuadro indica el intervalo intercuartílico; la línea indica la mediana; las barras indican un intervalo del 5-95 % y los puntos indican valores atípicos. Los datos se analizaron usando el ensayo U de Mann-Whitney para la comparación de sujetos TB y sin TB. Los valores de $P \leq 0,035$ se consideraron significativos y se indican.

45 Figura 5: El esputo muestra altos niveles de citocinas inmediatamente ex vivo. A: Comparación de los niveles de citocinas en suero (blanco), saliva (gris) y esputo (negro) de pacientes con TB ($n = 25, 20$ y 23 , respectivamente). Nótese que los valores que se muestran no están ajustados para la dilución de las citocinas del esputo durante la digestión. B: Análisis de los niveles de citocinas ex vivo de esputo de sujetos TB ($n = 23$) y sin TB ($n = 29$). El recuadro indica el intervalo intercuartílico; la línea indica la mediana; las barras indican un intervalo del 5-95 % y los puntos indican valores atípicos. Los datos se analizaron usando el ensayo U de Mann-Whitney para la comparación de sujetos TB y sin TB. Los valores de $P \leq 0,035$ se consideraron significativos y se indican.

55 Figura 6: Mapa térmico de los niveles de citocinas en esputo ex vivo. Se indican valores de la mediana (rojo = alto, azul = bajo) para sujetos con TB ($n = 23$) y aquellos con otros trastornos respiratorios (sin TB; $n = 29$).

Descripción detallada de la invención

60 La presente invención proporciona un método novedoso para detectar la tuberculosis en un sujeto. En lugar de intentar detectar antígenos de la tuberculosis (que son dinámicos y cambian dependiendo del estado de las bacterias, la cantidad presente, la cepa y la virulencia), el método usa ventajosamente biomarcadores del hospedador que proporcionan un distintivo proteico específico de la tuberculosis. Este distintivo no se ve afectado por la cepa de micobacteria subyacente a la infección, lo que hace que el método sea aplicable más ampliamente que los métodos existentes basados en antígenos. Además, el método puede usarse para distinguir la tuberculosis de otras afecciones pulmonares tales como la neumonía. Debido a que el método se realiza en muestras de esputo, pero sin requerir cultivo o estimulación antigénica, el método es rápido y puede realizarse en un entorno que no sea de laboratorio. Por tanto, el método puede realizarse sin el uso de agujas o muestras de sangre, sin requerir técnicas

de diagnóstico avanzadas y sin necesidad de infraestructuras tales como instalaciones médicas, electricidad, etc. Esto es particularmente importante para facilitar el uso del método en los países en desarrollo.

Detección de la tuberculosis

5 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar la tuberculosis en un sujeto. Por "detección de la tuberculosis" se entiende normalmente que el método puede usarse para determinar si un sujeto padece tuberculosis. Por tanto, en realizaciones particulares, el método puede usarse para diagnosticar la tuberculosis; estudiar una población de pacientes con el fin de detectar la presencia de tuberculosis; detectar una infección activa de tuberculosis; detectar la presencia de una infección micobacteriana (por ejemplo, por 10 *Mycobacterium tuberculosis*) de los pulmones; y/o controlar la progresión de una infección de tuberculosis en un sujeto.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica e infecciosa que generalmente está provocada por una infección con una micobacteria tal como *Mycobacterium tuberculosis*. En una realización, detección de la TB significa la 15 detección de una infección por una bacteria del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. El complejo *Mycobacterium tuberculosis* consiste en *M. tuberculosis sensu stricto*, *M. africanum*, *M. Beijing* y otros. Otras especies de micobacterias que pueden asociarse a la tuberculosis en algunos casos incluyen *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canetti* y *Mycobacterium microti*. Solo aproximadamente el 10 % de los sujetos infectados con dichas micobacterias desarrollan normalmente tuberculosis activa (es decir, sintomática). La infección activa de tuberculosis 20 generalmente afecta predominantemente a los pulmones, dando como resultado síntomas tales como dolor en el pecho, fiebre y tos crónica que produce esputo. También pueden aparecer síntomas extrapulmonares, por ejemplo, en los sistemas nervioso central y linfático. Por tanto, el presente método se usa normalmente para detectar una infección activa de tuberculosis, por ejemplo, en la que el sujeto muestra uno o más de los síntomas anteriores.

25 El presente método también puede usarse para distinguir la tuberculosis de otras enfermedades pulmonares o trastornos respiratorios, en particular, de la neumonía. El método también puede usarse para distinguir la tuberculosis de enfermedades pulmonares no infecciosas, tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el asma.

30 La neumonía es una afección inflamatoria del pulmón, normalmente provocada por una infección con virus o bacterias. Los síntomas de la neumonía también pueden incluir tos, pérdida de peso, dolor en el pecho y fiebre. Por tanto, en muchos casos es difícil distinguir la neumonía de la tuberculosis sin realizar una radiografía en el sujeto. Sin embargo, la neumonía y la tuberculosis suelen requerir un tratamiento con pautas terapéuticas bien diferenciadas y las consecuencias de un diagnóstico erróneo pueden ser muy graves. Por ejemplo, además de una 35 eficacia terapéutica reducida para el sujeto individual, el diagnóstico incorrecto puede conducir a un aumento de la transmisión de la enfermedad y a un aumento de la resistencia a los fármacos con el tiempo. En el presente documento se describe un método mejorado para determinar si un sujeto que se sospecha que padece una enfermedad pulmonar (por ejemplo, que muestra uno o más síntomas indicativos de tuberculosis y/o neumonía) padece tuberculosis u otra enfermedad pulmonar, tal como la neumonía.

40 Sujeto

En una realización, el sujeto es un ser humano. Sin embargo, el método de la presente invención no se limita a los seres humanos y también puede realizarse en, por ejemplo, mamíferos no humanos. En una realización preferida, el 45 sujeto es un ser humano adulto, aunque, en algunas realizaciones, el método puede realizarse en un niño o un bebé.

Normalmente, se sospecha que el sujeto padece una enfermedad pulmonar. Por tanto, el sujeto puede mostrar uno o más síntomas asociados a las enfermedades pulmonares, por ejemplo, tos crónica (normalmente con producción 50 de esputo), dolor en el pecho, dificultad para respirar, fiebre y/o pérdida de peso.

Muestra

55 En la presente invención, los biomarcadores se detectan en una muestra de esputo obtenida del sujeto. El esputo (o flema) es un fluido espeso y viscoso derivado de los pulmones. La muestra de esputo se extrae normalmente de los pulmones al toser. El esputo ha de distinguirse de la saliva, que es considerablemente menos espesa y deriva de la boca en lugar de los pulmones.

60 Los sujetos sospechosos de padecer una enfermedad pulmonar, tal como la tuberculosis, suelen producir cantidades significativas de esputo que pueden analizarse usando el método que se describe en el presente documento. Los protocolos para obtener muestras de esputo de sujetos son bien conocidos. Por ejemplo, en algunos casos puede instruirse a un sujeto para que respire profundamente una o dos veces y después tosa hasta que sea capaz de expectorar una muestra de esputo espesa y viscosa.

65 Si es necesario, pueden tomarse medidas adicionales para ayudar al sujeto a proporcionar una muestra de esputo. Respirar aire caliente y húmedo puede fluidificar la mucosidad de las vías respiratorias, lo que hace que sea más

fácil expulsar una muestra de esputo. Por ejemplo, un sujeto puede respirar vaho (por ejemplo, provisto de un nebulizador de mano o un nebulizador ultrasónico) que comprende una solución de sal al 3-15 % durante 5-15 minutos antes de toser.

5 Biomarcadores del sistema inmunitario del hospedador

En la presente invención, se detectan uno o más biomarcadores del sistema inmunitario del hospedador seleccionados entre IL-1Ra, IL-10, IL-13, IL-15, FGF, G-CSF y VEGF. Por "biomarcadores del hospedador" se entiende que los biomarcadores derivan del propio sujeto (en lugar de, por ejemplo, un patógeno que ha infectado al sujeto). Por ejemplo, los biomarcadores del hospedador pueden estar codificados por el genoma del sujeto en lugar del material genético de un agente infeccioso. Normalmente, los biomarcadores del hospedador son, por tanto, biomarcadores de proteínas humanas.

Por "biomarcadores del sistema inmunitario" se entiende normalmente que los biomarcadores se expresan en el sistema inmunitario del sujeto. Por ejemplo, los biomarcadores pueden ser expresados por células del sistema inmunitario (por ejemplo, leucocitos tales como los linfocitos, neutrófilos o macrófagos) o los biomarcadores pueden ejercer un efecto biológico en las células del sistema inmunitario.

Normalmente, los biomarcadores son péptidos o proteínas solubles. Por ejemplo, los biomarcadores pueden ser moléculas de señalización secretadas por células del sistema inmunitario y/o que se unen a receptores de la superficie celular en células del sistema inmunitario.

Los biomarcadores que se describen en el presente documento incluyen citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Las citocinas son un grupo de moléculas de señalización (por lo general proteínas o péptidos) que normalmente tienen efectos inmunomoduladores, con frecuencia por la unión a receptores en células del sistema inmunitario (por ejemplo, leucocitos). Los ejemplos de subgrupos de citocinas incluyen linfocinas, interleucinas e interferones.

Las respuestas de los linfocitos T auxiliares se clasifican habitualmente como Th1 o Th2, asociándose Th1 clásicamente a respuestas mediadas por células (por ejemplo, linfocitos T y citotóxicos T y macrófagos) contra patógenos intracelulares y Th2 a respuestas humorales (por ejemplo, producción de anticuerpos secretados por células B) contra patógenos extracelulares. Las respuestas Th1 y Th2 se asocian normalmente a citocinas particulares, que pueden clasificarse en consecuencia.

Las citocinas Th2 que se describen en el presente documento incluyen interleucina-4, interleucina-10 e interleucina-13. En el método de la invención, los biomarcadores incluyen IL-10 e IL-13. Una disminución del nivel de IL-10 o IL-13 en comparación con los valores de referencia es normalmente indicativa de la presencia de tuberculosis en el sujeto.

Como se demuestra en los ejemplos, la citocina Th1 IFN- γ tiene potencial de diagnóstico cuando se usa en combinación con otros biomarcadores.

Además de los mencionados anteriormente, se usan otras citocinas diversas en la presente invención. Estas citocinas incluyen el antagonista del receptor de la interleucina 1 (IL1Ra), la interleucina 15, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Una disminución del nivel de dichas citocinas en comparación con los valores de referencia es normalmente indicativa de la presencia de tuberculosis en el sujeto.

Las quimiocinas son moléculas de señalización que median la quimioatracción (quimiotaxis) entre células. Las quimiocinas normalmente son responsables del reclutamiento de células tales como los leucocitos (por ejemplo, neutrófilos, monocitos/macrófagos o linfocitos) a sitios de inflamación, por ejemplo, mediante la unión a receptores de la superficie celular en dichas células. Las quimiocinas son habitualmente péptidos o proteínas solubles y, en algunos casos, pueden clasificarse como un subgrupo de citocinas. Los ejemplos de quimiocinas que se describen en el presente documento incluyen la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α), la proteína inflamatoria de macrófagos-1 β (MIP-1 β), la proteína inducida por interferón gamma 10 (IP-10), RANTES (reguladas por activación, expresadas y secretadas por linfocitos T normales) y eotaxina.

Los factores de crecimiento son moléculas de señalización que normalmente son capaces de estimular el crecimiento celular, la proliferación y/o la diferenciación, incluyendo la angiogénesis. Algunos agentes que se clasifican como citocinas también pueden considerarse factores de crecimiento y viceversa, por ejemplo, VEGF, G-CSF y GM-CSF. Los factores de crecimiento son habitualmente proteínas o péptidos o esteroides. En la presente invención, los biomarcadores comprenden factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Normalmente, un aumento del nivel de dicho factor de crecimiento en la muestra de esputo en comparación con el valor de referencia es indicativo de la presencia de tuberculosis en el sujeto.

Combinaciones de biomarcadores

En realizaciones preferidas, se determinan los niveles de una pluralidad de (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más) de los marcadores del sistema inmunitario del hospedador en la muestra de esputo.

En una realización particularmente preferida, los biomarcadores se seleccionan entre el grupo que consiste en IL1Ra, IL-10, IL-13, IL-15, FGF, G-CSF, VEGF y/o IFN- γ . Más preferentemente, los biomarcadores comprenden IL-13, FGF y/o IFN- γ . Por ejemplo, en realizaciones específicas, los biomarcadores pueden comprender (i) IL-13 y FGF; (ii) IL-13 e IFN- γ ; (iii) FGF e IFN- γ ; o (iv) IL-13, FGF e IFN- γ .

Determinación de niveles de biomarcadores

En el presente método, los niveles de biomarcadores se determinan en una muestra de esputo del sujeto. La cantidad de un biomarcador particular en la muestra puede medirse mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, los métodos para detectar biomarcadores de proteínas pueden incluir el uso de un anticuerpo, una molécula de captura, un receptor o un fragmento del mismo que se une selectivamente a la proteína. Se conocen anticuerpos que se unen a los biomarcadores que se describen en el presente documento o pueden producirse mediante métodos conocidos en la técnica, incluyendo la inmunización de un animal y la recogida de suero (para producir anticuerpos policlonales) o células del bazo (para producir hibridomas mediante fusión con estirpes celulares inmortalizadas que conducen a anticuerpos monoclonales). Las secuencias de aminoácidos de los biomarcadores que se describen en el presente documento son conocidas y están disponibles en bases de datos de acceso público y pueden usarse para generar inmunógenos adecuados para la producción de anticuerpos. Las moléculas de detección, tales como los anticuerpos, pueden unirse opcionalmente a un soporte sólido tal como, por ejemplo, una superficie de plástico o perlas o en una matriz. Los formatos de ensayo adecuados para detectar niveles de proteínas incluyen, pero no se limitan a, un inmunoensayo tal como un ensayo inmunoenzimático (ELISA), radioinmunoensayo (RIE), transferencia de Western, matrices de anticuerpos, ensayos de citocinas múltiples e inmunoprecipitación.

En una realización preferida, los biomarcadores pueden detectarse usando un ensayo de citocinas múltiple, por ejemplo, usando microesferas Luminex™. Por ejemplo, pueden fijarse a microesferas anticuerpos que se unan específicamente a cada biomarcador de citocinas, por ejemplo, a microesferas Luminex™ diseñadas para su uso con un instrumento Luminex™. Puede mezclarse un gran número (por ejemplo, hasta 100) de diferentes tipos de microesferas y pueden analizarse juntos. En una realización, el método se realiza en un único recipiente de reacción. Cada población de microesferas puede distinguirse por su exclusivo color o distintivo de fluorescencia.

En un formato de ensayo de citocinas múltiple normal, diferentes tipos de perlas comprenden anticuerpos frente a diferentes biomarcadores de citocinas. Se deja incubar una alícuota de perlas con un pequeño volumen de muestra de esputo de ensayo. Después, las perlas se lavan para retirar la muestra no unida. Después se añade un anticuerpo de detección conjugado con un marcador detectable (por ejemplo, biotina, detectable mediante la adición de estreptavidina-ficoeritrina). Después, la muestra se analiza, por ejemplo, en un analizador de flujo, mediante separación de los diferentes tipos de perlas y la detección de la presencia del marcador. La intensidad de la señal de cada perla se compara con la intensidad de la señal de una perla de control negativo incluida en la preparación de perlas para determinar si la perla es positiva o negativa para cada citocina.

En otra realización, los biomarcadores pueden detectarse usando una matriz de anticuerpos. Una matriz de anticuerpos comprende normalmente una matriz de moléculas de inmunoglobulina o derivados funcionales o equivalentes de los mismos inmovilizados en regiones diferenciadas de un soporte sólido, de manera que diferentes regiones diferenciadas tienen especificidad por diferentes biomarcadores. El patrón de unión de las inmunoglobulinas inmovilizadas a sus antígenos respectivos es indicativo de la presencia de biomarcadores particulares en la muestra. Se desvelan matrices de anticuerpos adecuadas, por ejemplo, en Chang (1983) *J. Immunol. Methods* 65, 217 223 y en el documento WO00/39580.

Como alternativa, el nivel de la proteína biomarcadora puede determinarse mediante espectroscopia de masas. La espectroscopia de masas permite la detección y la cuantificación de un analito en virtud de su peso molecular. Puede emplearse cualquier método de ionización adecuado en el campo de la espectroscopia de masas conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, impacto electrónico (IE), ionización química (IQ), ionización de campo (IC), ionización por electronebulización (IEN), ionización por desorción con láser (IDL), ionización por desorción con láser asistida por matriz (IDLAM) y ionización por desorción con láser potenciada en superficie (IDLPS). Puede emplearse cualquier método de detección de espectrometría de masas adecuado, por ejemplo, espectroscopia de masas de cuadrupolo (EMC), espectroscopia de masas de transformada de Fourier (EM-TF) y espectroscopia de masas de tiempo de vuelo (EM-TDV).

Inmunoensayos de flujo lateral

En una realización particularmente preferida, el nivel del biomarcador se detecta usando un inmunoensayo de flujo lateral. Los inmunoensayos de flujo lateral son particularmente adecuados para ensayos en el punto de atención

(EPDA) en una sola etapa y proporcionan un medio sensible y rápido para la detección de moléculas diana. Pueden usarse inmunoensayos de flujo lateral en formatos de ensayo sándwich o competitivos. En general, pueden analizarse analitos de alto peso molecular con varios epítomos disponibles en un formato sándwich, mientras que pueden detectarse moléculas más pequeñas que representan solamente un único epítomo disponible por medio de un ensayo competitivo.

Se desvelan dispositivos de inmunoensayo de flujo lateral adecuados, por ejemplo, en los documentos US 2005/0175992 y US 2007/0059682. Normalmente, un dispositivo de flujo lateral puede ser en forma de una varilla o tira reactiva, que se sumerge en la muestra. El dispositivo puede formarse a partir de un material portador cromatográfico, de manera que el líquido en la muestra migra lateralmente desde una zona de aplicación a una zona de reactivo. Después, normalmente, las moléculas del analito encuentran un anticuerpo marcado específico para el analito y forman un complejo analito-anticuerpo. Después, este complejo continúa migrando lateralmente hacia una zona de línea de ensayo, en la que (por ejemplo, en un formato de ensayo sándwich) se inmoviliza un anticuerpo adicional sobre el material portador cromatográfico. Este segundo anticuerpo (inmovilizado) se une normalmente a un epítomo diferente en el analito comparado con el primer anticuerpo (marcado). La presencia del analito en la muestra se detecta, de este modo, mediante la visualización de una señal (tal como un cambio de color) en la zona de la línea de ensayo, debido a la captura del complejo de anticuerpo-analito marcado mediante el anticuerpo inmovilizado. En algunos casos, un anticuerpo adicional que se une al anticuerpo marcado tanto en presencia como en ausencia de analito (por ejemplo, un anticuerpo anti-inmunoglobulina, que se une a las regiones Fc del anticuerpo marcado) puede inmovilizarse en una zona de la línea de control que también está presente en la tira reactiva. Si el ensayo funciona correctamente, debe visualizarse una señal en la zona de la línea de control, ya sea que el analito esté o no presente en la muestra.

En realizaciones alternativas, los biomarcadores pueden detectarse mediante un inmunoensayo de flujo lateral competitivo. En un formato de ensayo de este tipo, la muestra normalmente se encuentra en primer lugar con un analito marcado o un análogo del mismo (en lugar de un anticuerpo marcado como en el formato de ensayo sándwich analizado anteriormente). Después, el analito derivado de la muestra migra junto con el analito marcado hacia la línea de ensayo, donde se inmovilizan los anticuerpos contra el analito. El analito no marcado en la muestra compete con el analito marcado para unirse al anticuerpo, de manera que la ausencia de una banda visible en la línea de ensayo es indicativa de la presencia del analito en la muestra. Este formato de ensayo puede emplearse, por ejemplo, cuando se desee proporcionar una señal visual positiva como indicador de la presencia de TB, por ejemplo, cuando el biomarcador es una citocina Th2, que disminuye en las muestras de esputo de sujetos con la enfermedad.

Anticuerpos

Los métodos de detección que se describen en el presente documento usan preferentemente uno o más anticuerpos que se unen a los biomarcadores del sistema inmunitario del hospedador que se describen en el presente documento. Los anticuerpos adecuados están disponibles en el mercado o pueden generarse usando técnicas conocidas.

Los anticuerpos comprenden moléculas de inmunoglobulina. Las moléculas de inmunoglobulina son, en el sentido más amplio, miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, una familia de polipéptidos que comprenden el plegamiento de inmunoglobulina característico de las moléculas de anticuerpo, que contiene dos láminas β y, generalmente, un enlace disulfuro conservado. Los anticuerpos, como se usan en el presente documento, se refieren a anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpos capaces de unirse a un biomarcador objetivo seleccionado, e incluyen Fv, ScFv, F(ab') y F(ab')₂, anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos modificados genéticamente que incluyen anticuerpos injertados con CDR y humanizados, y anticuerpos seleccionados artificialmente producidos usando presentación de fagos o técnicas alternativas.

Los anticuerpos pueden obtenerse a partir de suero animal o, en el caso de anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos, pueden producirse en cultivo celular. Puede usarse tecnología de ADN recombinante para producir los anticuerpos de acuerdo con un procedimiento establecido, en cultivos de bacterias, de levaduras, de insectos o, preferentemente, de células de mamíferos. El sistema de cultivo celular seleccionado preferentemente secreta el producto del anticuerpo.

El crecimiento de células de hibridoma o células de hospedador de mamífero in vitro se realiza en medios de cultivo adecuados, que son los medios de cultivo convencionales habituales, por ejemplo, Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) o medio RPMI 1640, opcionalmente rellenado con un suero de mamífero, por ejemplo, suero de ternera fetal, o elementos traza y complementos que sostienen el crecimiento, por ejemplo, células alimentadoras tales como células de exudado peritoneal de ratón normal, células de bazo, macrófagos de médula ósea, 2-aminoetanol, insulina, transferrina, lipoproteína de baja densidad, ácido oleico o similares. El medio de cultivo puede estar libre de suero o libre de productos animales, tales como un medio definido químicamente, con el fin de minimizar la contaminación derivada de animales. Análogamente se realiza la multiplicación de células hospedadoras que son células bacterianas o células de levadura en medios de cultivo adecuados conocidos en la

técnica, por ejemplo, para bacterias en medio LB, NZCYM, NZYM, NZM, Caldo Terrific, SOB, SOC, 2 x YT o Medio Mínimo M9 y para levadura en medio YPD, YEPD, Medio Mínimo o Medio Marginado Mínimo Completo.

Las células de insecto pueden cultivarse en medio sin suero, que es más barato y más seguro en comparación con el medio que contiene suero. El baculovirus recombinante puede usarse como un vector de expresión y la construcción se usa para transfectar una estirpe celular del hospedador, que puede ser cualquiera de una serie de estirpes celulares de lepidópteros, en particular *Spodoptera frugiperda Sf9*, como se sabe en la técnica. Altmann et al. proporcionan revisiones de la expresión de proteínas recombinantes en células hospedadoras de insectos (1999), *Glycoconj J* 1999, 16, 109-23 y Kost y Condreay (1999), *Curr Opin Biotechnol*, 10, 428-33.

La producción *in vitro* proporciona preparaciones de anticuerpos relativamente puras y permite el aumento a escala para proporcionar grandes cantidades de los anticuerpos deseados. Las técnicas para el cultivo de células bacterianas, levaduras, insectos y células de mamíferos son conocidas en la técnica e incluyen cultivos en suspensión homogénea, por ejemplo, en un reactor de transporte aéreo o en un reactor de agitador continuo o cultivos celulares inmovilizados o atrapados, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas., en microperlas de agarosa o cartuchos cerámicos.

También pueden obtenerse grandes cantidades de los anticuerpos deseados multiplicando células de mamíferos *in vivo*. Para este propósito, las células de hibridoma que producen los anticuerpos deseados se inyectan en mamíferos histocompatibles para provocar el crecimiento de tumores productores de anticuerpos. Opcionalmente, los animales se ceban con un hidrocarburo, especialmente aceites minerales tales como el pristano (tetrametil-pentadecano), antes de la inyección. Después de una a tres semanas, los anticuerpos se aíslan de los fluidos corporales de esos mamíferos. Por ejemplo, las células de hibridoma obtenidas por fusión de células de mieloma adecuadas con células de bazo productoras de anticuerpos de ratones Balb/c o células transfectadas derivadas de la estirpe celular de hibridoma Sp2/0 que producen los anticuerpos deseados se inyectan por vía intraperitoneal en ratones Balb/c, opcionalmente pretratados con pristano, y, después de una o dos semanas, se extrae líquido ascítico de los animales.

Las técnicas anteriores y otras se analizan, por ejemplo, en Kohler y Milstein, (1975) *Nature* 256: 495-497; documento US 4.376.110; Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (1988) Cold Spring Harbor. Se describen técnicas para la preparación de moléculas de anticuerpos recombinantes en las referencias anteriores y también, por ejemplo, en los documentos EP 0623679; EP 0368684 y EP 0436597.

Los sobrenadantes de cultivo celular se seleccionan para detectar los anticuerpos deseados, preferentemente mediante tinción inmunofluorescente de células que expresan la diana deseada mediante inmunotransferencia, mediante un inmunoensayo enzimático, por ejemplo, un ensayo sándwich o un ensayo puntual o un radioinmunoensayo.

Para el aislamiento de los anticuerpos, las inmunoglobulinas en los sobrenadantes de cultivo o en el líquido ascítico pueden concentrarse, por ejemplo, mediante precipitación con sulfato de amonio, diálisis contra material higroscópico tal como polietilenglicol, filtración a través de membranas selectivas o similares. Si es necesario y/o si se desea, los anticuerpos se purifican mediante los métodos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa y/o cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo, cromatografía de afinidad con una proteína que contiene una diana o con proteína A.

Los anticuerpos generados de acuerdo con los procedimientos anteriores pueden clonarse mediante el aislamiento del ácido nucleico de las células, de acuerdo con los procedimientos convencionales. De manera útil, los dominios variables de los ácidos nucleicos de los anticuerpos pueden aislarse y usarse para construir fragmentos de anticuerpos, tales como scFv.

Los métodos que se describen en el presente documento pueden emplear ácidos nucleicos recombinantes que comprendan un inserto que codifica un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos. Por definición, dichos ácidos nucleicos comprenden ácidos nucleicos monocatenarios codificantes, ácidos nucleicos bicatenarios que consisten en los ácidos nucleicos codificantes y ácidos nucleicos complementarios a los mismos o estos ácidos nucleicos complementarios (monocatenarios) en sí.

Los anticuerpos también pueden generarse mediante mutagénesis de genes de anticuerpos para producir repertorios artificiales de anticuerpos. Esta técnica permite la preparación de bibliotecas de anticuerpos; las bibliotecas de anticuerpos también están disponibles en el mercado. Por tanto, pueden usarse repertorios artificiales de inmunoglobulinas, preferentemente repertorios artificiales de ScFv, como fuente de inmunoglobulina.

Los anticuerpos aislados o clonados pueden unirse a otras moléculas, por ejemplo, medio de asociación de ácido nucleico o proteína mediante acoplamiento químico, usando protocolos conocidos en la técnica (por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: a Laboratory Manual*, (1988) Cold Spring Harbor y Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1991), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory

Press). Dichos métodos pueden usarse para producir anticuerpos marcados o para inmovilizar el anticuerpo en una fase sólida.

En algunas realizaciones (por ejemplo, que implican inmunoensayos de flujo lateral), el anticuerpo puede estar marcado. Normalmente, un anticuerpo marcado es capaz de producir una señal detectable. La señal puede ser, por ejemplo, la generación de una actividad enzimática, tal como actividad de proteasa, actividad transcripcional o actividad inductora de luminiscencia. Preferentemente, sin embargo, la señal es emisión o absorción de radiación electromagnética, por ejemplo, luz. Más preferentemente, la señal es una señal visible, por ejemplo, la señal es detectable a simple vista. La señal puede ser, por ejemplo, un cambio de color que tiene lugar cuando el anticuerpo marcado está presente.

Los métodos para conjugar marcadores visibles o fluorescentes con diversas entidades, incluyendo péptidos, polipéptidos y anticuerpos, son bien conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones, puede ser deseable incluir medios de separación entre el anticuerpo y el marcador. Los medios de separación pueden comprender enlazadores o espaciadores que son polímeros de diferentes longitudes (cuya longitud puede controlarse controlando el grado de polimerización). Se conocen en la técnica numerosos espaciadores y enlazadores y los expertos sabrán cómo elegirlos y usarlos, dependiendo de la aplicación. El experto también sabrá qué longitud de espaciador usar.

Comparación con los valores de referencia

En la presente invención, los niveles de los biomarcadores en la muestra de esputo se comparan con uno o más valores de referencia. El valor de referencia puede ser, por ejemplo, una medición predeterminada de un nivel del biomarcador que está presente en una muestra de esputo de un sujeto normal, es decir, un sujeto que no padece tuberculosis. En algunas realizaciones, el valor de referencia puede derivar de un sujeto (o una población de sujetos) que padece una enfermedad pulmonar distinta de la tuberculosis, por ejemplo, neumonía. El valor de referencia puede basarse, por ejemplo, en un nivel medio o en la mediana del nivel del biomarcador en una población de control de sujetos, por ejemplo, 5, 10, 100, 1000 o más sujetos (que pueden estar emparejados por edad o género o pueden no estar emparejados con el sujeto de ensayo) que no muestran ningún síntoma de tuberculosis. Preferentemente, el nivel del biomarcador en la muestra de ensayo difiere en al menos el 1 %, el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 % o al menos el 50 % en comparación con el valor de control.

El valor de control puede determinarse usando los métodos correspondientes para la determinación de los niveles de lípidos en la muestra de ensayo, por ejemplo, usando una o más muestras tomadas de una población control de sujetos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, pueden determinarse los niveles de biomarcadores en muestras de control en ensayos paralelos a las muestras de ensayo. En realizaciones alternativas, el valor de control puede haberse determinado anteriormente o puede calcularse o extrapolarse, sin tener que realizar una determinación correspondiente en una muestra de control con respecto a cada muestra de ensayo obtenida.

En el caso de los ensayos de flujo lateral, la presencia o ausencia del biomarcador en la muestra puede determinarse normalmente mediante la presencia o ausencia de una señal visible (por ejemplo, un cambio de color) en la calle de ensayo en el dispositivo de flujo lateral, es decir, el resultado normalmente puede determinarse a simple vista. El experto en la materia reconocerá que los dispositivos de flujo lateral también pueden usarse para determinar si un nivel de un biomarcador en particular está por encima o por debajo de un valor de corte particular (que puede corresponder al valor de referencia como se describe en el presente documento). Los valores de corte y de referencia generalmente pueden determinarse usando diversas técnicas estadísticas, incluyendo el análisis de Curva de Receptor-Operador, tal como se describe en los ejemplos a continuación.

Por ejemplo, la disposición y las condiciones del ensayo y las cantidades relativas de anticuerpos marcados, inmovilizados y de control pueden seleccionarse de manera que la intensidad de la señal visual en la calle de ensayo se pueda comparar con la señal visual en la calle de control para proporcionar una indicación de si el nivel del biomarcador está por encima o por debajo del valor de referencia. Como alternativa, el ensayo de flujo lateral puede realizarse en una muestra del sujeto en paralelo con un ensayo separado (control) en una muestra de un sujeto que se sabe que no padece tuberculosis. El control también puede ser una muestra no derivada de un paciente pero que contiene una cantidad definida del biomarcador. En cualquier caso, la comparación de los resultados de la tira reactiva con la tira de control puede proporcionar una indicación de los niveles del biomarcador en la muestra de esputo del sujeto en comparación con el valor de referencia.

En otra realización alternativa, la señal en el dispositivo de flujo lateral puede cuantificarse para proporcionar una indicación más precisa de los niveles de biomarcadores. Por ejemplo, la intensidad de la señal en la línea de ensayo puede determinarse con el fin de cuantificar la cantidad de analito en la muestra. Pueden usarse dispositivos de diagnóstico de mano, tales como lectores de flujo lateral, por ejemplo, para iluminar la calle de ensayo y medir una longitud de onda específica de la luz indicativa del marcador. Los algoritmos de procesamiento de imágenes pueden incorporarse en dichos lectores para correlacionar la señal con las concentraciones de analito.

Tratamiento de la enfermedad pulmonar

La presente divulgación también describe un método de tratamiento de un sujeto que se sospecha que padece una enfermedad pulmonar o un trastorno respiratorio. Normalmente, el método comprende una etapa de realización de un método de detección como se ha descrito anteriormente y de tratamiento del sujeto basándose en los resultados del mismo. En particular, si los niveles de biomarcadores en la muestra de esputo son indicativos de la presencia de tuberculosis en el sujeto, el método generalmente implica una etapa de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento antituberculoso (por ejemplo, que comprende uno o más agentes terapéuticos) al sujeto. Normalmente, un tratamiento de este tipo para la TB continúa durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses o al menos 6 meses.

Si los niveles de biomarcadores en la muestra de esputo son indicativos de la ausencia de tuberculosis en el sujeto, el método puede implicar una etapa de administrar una terapia alternativa para la enfermedad pulmonar al sujeto. La terapia alternativa puede ser un tratamiento para, por ejemplo, la neumonía, el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Por ejemplo, puede administrarse un agente terapéutico antineumónico al sujeto. Comúnmente, dichos tratamientos para enfermedades pulmonares distintas de la TB pueden ser más a corto plazo que los tratamientos para la TB. Por tanto, en dichas realizaciones, el tratamiento puede continuar hasta 1 semana, hasta 2 semanas, hasta 3 semanas o hasta 1 mes.

Los agentes terapéuticos y los protocolos útiles para tratar la tuberculosis son bien conocidos por los expertos. Por ejemplo, la terapia contra la tuberculosis puede comprender la administración de uno o más agentes seleccionados entre isoniazida, rifampicina, etambutol y/o pirazinamida. Normalmente, la infección por TB activa se trata con dos o más agentes terapéuticos en combinación. El tratamiento se administra preferentemente durante al menos 6 meses, aunque esto puede dividirse en un período de tratamiento intensivo inicial seguido de un período de continuación prolongado. Por tanto, el tratamiento convencional de corta duración para la infección activa de TB es isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol durante dos meses, seguido de isoniazida y rifampicina solo durante otros cuatro meses. En el caso de fracaso de una terapia de primera línea, puede usarse una terapia de segunda línea en algunos casos. Las terapias de segunda línea pueden incluir aminoglucósidos (por ejemplo, amikacina, kanamicina); fluoroquinolonas (por ejemplo, ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino); tioamidas (por ejemplo, etionamida, protionamida); cicloserina (por ejemplo, closerina); terizidona, capreomicina, viomicina o enviomicina.

Por el contrario, los agentes terapéuticos utilizados para tratar la neumonía (en particular la neumonía bacteriana) son antibióticos de amplio espectro. Por ejemplo, los agentes antibióticos adecuados incluyen amoxicilina, doxiciclina, claritromicina, macrólidos (tales como azitromicina o eritromicina). En algunos casos, también pueden usarse cefalosporinas, carbapenémicos y vancomicina, por ejemplo, administrados por vía intravenosa y combinados, en particular en el caso de infecciones adquiridas en el hospital. Normalmente, el tratamiento puede administrarse durante, por ejemplo, de 3 a 5 días, de 7 a 10 días o de hasta 2 semanas.

El agente terapéutico puede administrarse a un sujeto usando una diversidad de técnicas. Por ejemplo, el agente puede administrarse por vía sistémica, lo que incluye mediante inyección incluyendo por vía intramuscular o intravenosa, oral, sublingual, transdérmica, subcutánea o intranasal. Preferentemente, el agente se administra por vía oral. La concentración y la cantidad del agente terapéutico que se administrará normalmente variarán, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad, el tipo de agente que se administra, el modo de administración y la edad y la salud del sujeto.

El agente terapéutico puede formularse en una composición farmacéutica, por ejemplo, en forma sólida o de comprimido o en forma líquida, por ejemplo, junto con un diluyente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener habitualmente cantidades farmacéuticamente aceptables de diluyentes, excipientes y otros vehículos adecuados. Los vehículos y formulaciones apropiados se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, EE.UU. 1985).

Kits

La presente invención también describe un kit adecuado para realizar el método como se ha descrito anteriormente. En particular, el kit puede comprender reactivos adecuados para detectar los biomarcadores descritos anteriormente, por ejemplo, uno o más biomarcadores del sistema inmunitario del hospedador, o una combinación de biomarcadores como se define en el presente documento. Normalmente, los reactivos pueden comprender anticuerpos que se unen específicamente a los biomarcadores o una combinación de biomarcadores como se define en el presente documento. Por ejemplo, el kit puede comprender uno, dos, tres o cuatro anticuerpos diferentes, cada uno de los cuales se une a un biomarcador diferente seleccionado entre los definidos anteriormente.

Dichos kits pueden comprender además opcionalmente uno o más componentes adicionales, por ejemplo, reactivos adecuados para realizar un ensayo ELISA usando anticuerpos que se unen a los biomarcadores. Por ejemplo, los kits pueden comprender anticuerpos de captura y detección para cada biomarcador, anticuerpos secundarios, reactivos de detección, fases sólidas (por ejemplo, placas o perlas de reacción), patrones (por ejemplo, concentraciones conocidas de cada biomarcador en forma de proteínas recombinantes), así como tampones

adecuados para realizar cualquier etapa de un método ELISA. Los kits pueden comprender adicionalmente viales, recipientes y otros materiales de embalaje para almacenar los reactivos anteriores, así como instrucciones para realizar un método como se define en el presente documento.

- 5 El kit puede estar en forma de, o puede comprender, un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral. Un dispositivo de este tipo puede comprender uno o más anticuerpos que se unen específicamente a un biomarcador del sistema inmunitario del hospedador o una combinación de biomarcadores, como se describe en el presente documento. Los anticuerpos adecuados están disponibles en el mercado o pueden generarse usando técnicas conocidas.
- 10 La invención se describirá ahora a modo de ejemplo solamente con respecto a las siguientes realizaciones específicas.

Ejemplos

- 15 En el presente estudio, se analizaron varios tipos de muestras para determinar la combinación óptima de líquido y biomarcador para el diagnóstico de TB. Los biomarcadores del esputo del hospedador fueron significativamente más altos que los niveles en sangre estimulada con antígenos y dieron como resultado una clasificación correcta del 96 % de TB, independientemente del frotis o el estado del VIH. Por tanto, la presente invención proporciona un ensayo que permite la detección "sin laboratorio" de la TB. Los beneficios de esto están claros: con 10 millones de diagnósticos nuevos cada año, pero solo el 16 % confirmado por laboratorio, la capacidad de detectar rápidamente la TB reducirá considerablemente la carga de la TB.
- 20

Métodos

- 25 Sujetos:

Los sujetos se reclutaron consecutivamente en la consulta externa y el pabellón de la Unidad del Consejo de Investigación Médica, Fajara, Gambia. Todos los sujetos eran adultos (≥ 18 años) que presentaban una tos que había durado más de 2 semanas más otro síntoma clínico (es decir, pérdida de peso, fiebre) que sugería TB. Los criterios de exclusión incluyeron el tratamiento previo para la TB o comorbilidades tales como la malaria. Tras el consentimiento informado por escrito, todos los sujetos se sometieron a evaluaciones hematológicas, microbiológicas, bioquímicas y sintomáticas. Se realizaron ensayos de VIH y se recogieron muestras de esputo, saliva, suero y sangre heparinizada para evaluaciones inmunitarias. Se usaron síntomas clínicos (cuestionario, examen físico), radiografías de tórax y microbiología (frotis de esputo y cultivo) para clasificar a los pacientes en dos grupos: aquellos con TB confirmada por cultivo y aquellos con otras enfermedades respiratorias (**Figura 1**). El cultivo de esputo se realizó con un cultivo líquido (BACTEC™, Becton-Dickinson, EE.UU.) y la presencia del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) se confirmó usando ensayos rápidos de TB Capilia (Taun Laboratories, Japón). La aprobación ética se obtuvo del comité de ética conjunto del gobierno de Gambia/MRC.

30

35

- 40 Confirmación microbiológica

Las muestras de esputo se analizaron mediante tinción de ZiehlNielsen (ZN) usando microscopía LED. Se descontaminó y cultivó una alícuota (BACTEC™, Becton-Dickinson, EE.UU.). Los cultivos positivos se confirmaron mediante ensayo rápido de TB Capilia (Taun, Japón) y se almacenaron en glicerol a -70 °C.

45

Espoligotipado

Los aislados almacenados se cultivaron en caldo Middlebrook 7H9 con un complemento de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) para la extracción de ADN. Se usaron 10 ng de ADN para el análisis de espoligotipos con membranas disponibles en el mercado (Isogen Biosciences, Países Bajos). Las películas de espoligotipado se escanearon y clasificaron usando un software diseñado en Matlab (Mathworks, EE.UU.), seguido de la edición y confirmación manuales. Cada patrón de espoligotipado se clasificó en un código binario y el resultado se ingresó en una base de datos de Microsoft Access (Redmond, EE.UU.). Para los aislados que no pudieron clasificarse de manera fiable como *M. tuberculosis* o *M. africanum* basándose solamente en el análisis de espoligotipado, se evaluó la presencia o ausencia de linaje que define los polimorfismos de secuencia grande RD702 y TbD1, como se ha descrito anteriormente.

50

55

Ensayos de citocinas múltiples

- 60 Preparaciones de muestras

El suero y la saliva se dividieron en alícuotas y se congelaron a -20 °C hasta que se necesitaron. El esputo se digirió durante 15 minutos a temperatura ambiente con Ditiotretitol (DTT) al 0,1 %. Se añadió un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS), las muestras se centrifugaron (600_gmax, 5 min) y el sobrenadante se recogió y almacenó a -20 °C. Para la sangre heparinizada, se usaron 450 µl de sangre sin diluir por pocillo de una placa de 24 pocillos. La sangre se estimuló con un derivado proteínico purificado (PPD, por sus siglas en inglés) (10 µg/ml;

65

Statens Serum Institute, Dinamarca), ESAT-6/CFP-10 (EC; 10 µg/ml) y dos antígenos de latencia, Rv0081 y Rv2029 (ambos a 10 µg/ml). Después de 24 horas de incubación (37 °C, 5 % de CO₂), los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a 20 °C antes del análisis.

5 Análisis múltiple para la producción de citocinas.

Las muestras se analizaron usando un kit personalizado Bio-Plex de 13-plex (sangre estimulada) o de 27-plex (suero, saliva y esputo) premezclado de citocinas/quimiocinas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bio-Rad, Bélgica). Después de humedecer anteriormente la placa de filtro, se añadieron 50 µl de suspensión de perlas a cada pocillo y se lavaron dos veces. Después se añadieron 50 µl de muestras y patrones y se incubaron durante 1 hora a 300 rpm. La placa se lavó 3 veces y después se añadieron 50 µl de anticuerpo de detección y la placa se incubó durante 30 minutos a 300 rpm. Después del lavado, se añadieron 25 µl de estreptavidina-PE a cada pocillo y se incubaron durante 10 min. La placa se lavó de nuevo y se resuspendió en 125 µl de tampón de ensayo, se selló, se mezcló y se leyó inmediatamente en el analizador Bio-plex usando el software administrador Bioplex (versión 4.0). Se usó un control de calidad para cada placa para controlar la variación entre ensayos.

Análisis estadístico

Al valor de los analitos medidos a partir de muestras específicas de antígenos (solo análisis de sangre entera) se le restó el valor de fondo (resultados sin estimular). Todos los valores de saliva, suero y esputo derivaron de muestras no estimuladas y, por tanto, no requirieron la resta del valor de fondo. Los sujetos con TB y sin TB se compararon usando el ensayo U de Mann-Whitney, regresión logística y se realizaron análisis de la curva receptor-operador y se ajustaron por edad y sexo. Los cultivos de esputo y estimulados con antígeno emparejados se analizaron usando el ensayo de Friedman seguido del ensayo de comparaciones múltiples de Dunn. Se generaron gráficos usando Graphpad Prism versión 6.0 (Software MacKiev, EE.UU.) y análisis estadístico con SPSSv20 (IBM, EE.UU.). Los valores de $P \leq 0,035$ se consideraron significativos para tener en cuenta las tasas de descubrimiento falso (TDF).

Resultados

30 Demografía de los sujetos

En total, se analizaron 52 sujetos sin TB y 27 con TB confirmados (Figura 1). No hubo diferencia en la mediana de la edad entre los sujetos con TB y sin TB, pero el grupo con TB tuvo una proporción significativamente superior a hombres en comparación con el grupo sin TB (el 81 % en comparación con el 49 %). Esto encaja con la epidemiología de la tuberculosis en Gambia y, como tal, todos los resultados se ajustaron por sexo y edad. Del grupo sin TB, los diagnósticos finales se basaron en la evaluación clínica y la respuesta al tratamiento con 13/52 sujetos diagnosticados con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC; n = 5), asma (n = 2), neumonía (n = 6) y el resto se agrupó en infecciones generales del aparato respiratorio (IAR; diagnóstico no confirmado). El número de sujetos varió para cada tipo de muestra debido a la disponibilidad de la muestra (Figura 1): se usaron 20 sujetos con TB y 26 sin TB para el análisis de estimulación de antígenos de sangre entera (ESE); 25 sujetos con TB y 52 sin TB para el análisis de suero; 20 sujetos con TB y 42 sin TB para el análisis de saliva y 23 sujetos con TB y 29 sin TB para el análisis de esputo.

45 Clasificación de la TB usando sobrenadantes de cultivos estimulados con antígeno de 24 horas en sangre entera

Se analizaron perfiles de citocinas de sujetos con TB y sin TB después de la estimulación durante la noche con Nil (sin antígeno), EC, PPD, Rv0081 y Rv2029. Los perfiles se compararon estimulación por antígeno (Ag), Ag-Nil y Nil para cada citocina. Los niveles de IP10 y MCP-1 fueron altos en ambos grupos después de todas las estimulaciones (valores medios 7522 pg/ml y 6547 pg/ml respectivamente), mientras que TGF-α, EGF y VEGF fueron bajos (valores medios 9 pg/ml, 26 pg/ml y 23 pg/ml respectivamente). Hubo una cantidad de analitos que fueron significativamente más altos en sujetos con TB confirmada en comparación con los cultivos sin TB en Nil, incluyendo IP10, CD40L, TGF-α, TNF-α e IFN-γ ($p = 0,0005$, $p = 0,0089$, $p = 0,0020$, $p = 0,0016$ y $p = 0,0313$, respectivamente; Fig. 2). Después de la estimulación con antígeno, la mayoría de las diferencias se observaron antes de restar el valor de fondo con niveles de CD40L y TGF-α significativamente más altos en TB en comparación con los sujetos sin TB, independientemente del antígeno utilizado. Después de restar el valor de fondo, se observó la mayor parte de las diferencias en los cultivos estimulados con PPD con mayores niveles de CD40L, IL-10 y TGF-α en TB en comparación con sujetos sin TB ($p = 0,0089$, $p = 0,0034$ y $p \leq 0,0001$, respectivamente), pero niveles más bajos de IFN-γ, IL-2 y MIP-1β ($p = 0,0313$, $p = 0,0040$ y $p = 0,0351$ respectivamente; Fig. 3). Se realizaron análisis de regresión logística para determinar la combinación óptima de antígeno y biomarcador para el diagnóstico de TB: después de la estimulación con PPD, el mejor clasificador fue TGFα con un ABC de 0,86 [IC del 95 % 0,73-1,0], sensibilidad del 96,2 % [IC del 95 % 80,4-99,9], especificidad del 80,0 % [IC del 95 % 56,3-94,3] y una relación de probabilidad de 4,8. Tras la estimulación de la EC, los niveles de TGF-α dieron como resultado una sensibilidad del 84,6 % [IC del 95 %: 65,1-95,6] y una especificidad del 80 % [IC del 95 % 56,3-94,3]. La mejor clasificación se consiguió después de la estimulación con PPD con una combinación de CD40L, TGFα e IL10, lo que proporcionó una clasificación correcta del 89 % de TB o sin TB (datos no mostrados). Es importante destacar que no hubo diferencias en los perfiles inmunitarios del hospedador para los sujetos con TB infectados con diferentes cepas de

Mtb (*M. tuberculosis* o *M. africanum*) después de la estimulación con cualquiera de los antígenos (datos no mostrados).

Análisis de niveles de saliva y citocinas plasmáticas ex vivo:

- 5 Un factor importante para un ensayo diagnóstico eficaz en los países en desarrollo es el momento del diagnóstico. Por tanto, los inventores quisieron evaluar los fluidos corporales para determinar los niveles de citocinas inmediatamente *ex vivo*. La saliva mostró niveles más altos de citocinas que el suero, pero no se observaron diferencias entre los sujetos con TB y sin TBC para ninguna citocina analizada (Fig. 4A). El suero tenía niveles relativamente bajos de todas las citocinas detectándose MIP-1 β en el nivel más alto (86 pg/ml) en sujetos con TB.
- 10 Sin embargo, hubo niveles significativamente más altos de IL-6, IL7 y G-CSF en suero de TB en comparación con los sujetos sin TB ($p < 0,0001$, $p = 0,0014$ y $p = 0,0003$, respectivamente; Fig. 4B).

El esputo muestra altos niveles de citocinas inmediatamente *ex vivo*:

- 15 Los inventores analizaron la fracción soluble del esputo digerido para los niveles de citocinas *ex vivo* y encontraron niveles sorprendentemente altos sin requerir estimulación antigénica en comparación con la saliva y el suero. Se realizó un análisis transversal de los niveles de citocinas *ex vivo* de sujetos que se confirmó que tenían TB (Fig. 5A). Los niveles de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-7, IL-8, IL-12 (p70) y MIP-1 β fueron todos significativamente más altos en el esputo en comparación con la saliva y el suero (ilustrado en la Fig. 5A por IL-7 e IL-8), mientras que IL1 β , IL-17, G-CSF, GM-CSF, MCP-1 y TNF- α fueron significativamente mayores en saliva y esputo en comparación con el suero (ilustrado en la Fig. 5A por G-CSF y MCP-1). IL6 fue la única citocina menor en saliva en comparación con el suero ($p < 0,01$) y el esputo ($p < 0,0001$) sin diferencias entre el suero y el esputo (datos no que se muestran), sin diferencias en los niveles de IFN- γ observados entre los tres tipos de muestras (Fig. 5A).

- 25 A continuación, se comparan los niveles de citocinas en el esputo de sujetos TB y sin TB (Fig. 6 y Fig. 5B). Curiosamente, no se encontraron diferencias significativas en las citocinas proinflamatorias (es decir, TNF- α , IFN- γ , IP-10; datos no mostrados) pero se descubrieron niveles significativamente más bajos de IL-10 ($p = 0,004$), IL-13 ($p = 0,003$) e IL-15 ($p = 0,022$) en el esputo de TB en comparación con los sujetos sin TB (Fig. 6 y Fig. 5B). Adicionalmente, las citocinas innatas IL-1Ra, G-CSF y VEGF fueron significativamente más bajas ($p = 0,005$, $p = 0,004$, $p = 0,030$ respectivamente), mientras que el FGF fue significativamente mayor en la tuberculosis en comparación con los sujetos sin TB (mediana de 287 pg/ml en TB comparado con 2,2 pg/ml en sujetos sin TB, $p = 0,007$; Fig. 6 y Fig. 5B). Los niveles de FGF solo proporcionaron una clasificación correcta del 74 % (sensibilidad del 78 % [IC del 95 % 56-93] y una especificidad del 67 % [IC del 95 % 47-83]) de TB. La regresión logística mostró que una combinación de IL-13, FGF e IFN- γ proporcionó una clasificación correcta del 96 % de TB y un 85 % de sin TB (total 90 %). Es importante destacar que no se observaron diferencias en los sujetos con coinfección por VIH como se observó anteriormente con el análisis del líquido pleural [5].

- 40 La confirmación microbiológica de TB se realizó en 2-3 muestras por paciente, con muestras que varían en el momento de la recogida (3 muestras dentro de las 24 h es referencia en MRC). Existe una variación en los resultados de frotis con diferentes muestras y, por tanto, se quisieron determinar los niveles de citocinas en múltiples muestras de esputo obtenidas de la misma persona ($n = 15$). No se encontraron diferencias en los niveles de citocinas analizados (Fig. 5C).

Análisis

- 45 Junto con la alta sensibilidad y especificidad, un criterio importante para el desarrollo de un ensayo en el punto de atención basado en flujo lateral para la TB es el tiempo para los resultados. La pérdida de seguimiento o el incumplimiento de la atención es un problema importante en la prestación de asistencia sanitaria en entornos de recursos escasos; por tanto, es imperativo que los pacientes puedan ser diagnosticados y recibir la atención adecuada a las pocas horas de someterse a un ensayo de TB [2]. Los ensayos de diagnóstico actuales basados en factores inmunitarios del hospedador derivados de la sangre requieren al menos 24 horas de procesamiento de la muestra, e incluso entonces los niveles con frecuencia son demasiado bajos para el desarrollo adicional de un ensayo rápido. Hasta donde se sabe, los inventores son el primer grupo en examinar los niveles de citocinas en el esputo como nueva herramienta para el diagnóstico de la TB. Se encontraron niveles extremadamente altos de citocinas en el esputo *ex vivo* con un mínimo de preparación de la muestra; una combinación de FGF, IL-13 e IFN- γ dio como resultado una clasificación correcta de la tuberculosis del 96 % en sujetos que presentan síntomas similares (es decir, la duración de la tos > 2 semanas). Estos hallazgos permiten el desarrollo de un ensayo rápido en el punto de atención para la TB.

- 60 Anteriormente, los inventores han demostrado que la sensibilidad y la especificidad para la TB aumentaron significativamente mediante el análisis de las muestras del sitio de infección en comparación con la sangre [5]. Esto se debe a la migración de linfocitos T CD4+ efectoras al pulmón desde la sangre durante la enfermedad TB, dando como resultado una ausencia virtual de estas células en la sangre, pero en una población predominante y altamente activada en el pulmón [5]. Estas células son responsables de la producción de IFN- γ y otras citocinas necesarias para combatir la infección y, por tanto, se correlacionan directamente con el aumento de los niveles de factores solubles presentes en las muestras derivadas de pulmón en comparación con la sangre. El esputo se usa

habitualmente para la detección microbiológica de Mtb. Es fácil de obtener y los niveles de citocinas no parecen verse afectados por la coinfección por el VIH, haciéndolo un tipo de muestra ideal para el desarrollo de un ensayo de flujo lateral para la TB. Además, no hubo influencia de la cepa de la infección y la reproducibilidad fue alta con diferentes muestras de esputo del mismo sujeto.

5 Los niveles de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-7, IL-8 y MIP-1b fueron todos significativamente más altos en el esputo en comparación con la saliva y el suero, mientras que IL-1b, IL-17, G-CSF, GM-CSF, MCP-1 y TNF- α fueron todos significativamente más bajos en el suero en comparación con la saliva y el esputo, sin diferencia entre la saliva y el esputo. Estos hallazgos ilustran la diferencia en los subconjuntos inmunitarios que responderán localmente en comparación con la periferia. Por ejemplo, se observaron niveles elevados de citocinas innatas y Th17 en la saliva y el esputo en comparación con la sangre, lo que indica un aumento de la inmunidad asociada a la mucosa en estos sitios. Curiosamente, no se observaron diferencias en los niveles de citocinas Th1 entre los tipos de muestras *ex vivo* y tampoco hubo diferencias significativas en los niveles de IFN- γ , IP-10 y TNF- α en el esputo *ex vivo* de sujetos con TB en comparación con los sujetos con otros trastornos respiratorios. Por el contrario, las citocinas Th2, IL10 e IL-13 fueron significativamente más bajas en los sujetos con TB en comparación con los sujetos sin TB; lo que indica un sesgo hacia las respuestas Th1 en sujetos con TB, lo que podría dar como resultado un aumento de la patología inmunitaria. Se requiere G-CSF para el reclutamiento de neutrófilos y se descubrió que era significativamente más bajo en el esputo de sujetos con TB en comparación con los sujetos sin TB. Esto es interesante puesto que los neutrófilos son un componente importante en la respuesta inmunitaria protectora a la TB [8] y se ha demostrado que la administración de G-CSF aumenta la respuesta a la terapia de TB [9]. Si bien la mayoría de los factores fueron más bajos en los sujetos con TB en comparación con los sujetos sin TB, el FGF fue significativamente más alto. La vía de señalización del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) es integral a la patogenia de muchas enfermedades de las vías respiratorias y en el crecimiento y desarrollo del pulmón normal [10]. Curiosamente, los fibroblastos infectados con Mtb pierden su capacidad para la presentación de antígenos, lo que sugiere que Mtb puede evadir la vigilancia inmunitaria de los linfocitos T auxiliares mediante la infección de los fibroblastos, dando como resultado de este modo una persistencia bacteriana [11].

Los requisitos de desarrollo de diagnóstico determinados por FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics (Fundación para Nuevos Diagnósticos Innovadores) incluyen una sensibilidad de al menos el 75 % e, idealmente, del 95 % (incluyendo el 100 % de las muestras con cultivo positivo). Solo se analizaron los sujetos con TB confirmada por cultivo y de estos, solo 3 tuvieron frotis negativos (14 %), por lo que es difícil en esta etapa determinar la sensibilidad en sujetos con frotis negativo. Sin embargo, una clasificación correcta del 96 % de sujetos con TB con una combinación de FGF, IL-13 e IFN- γ de esputo es significativamente más alta que los resultados notificados de los ensayos actuales basadas en sangre, aliento u orina. Los inventores limitaron su análisis a 27 citocinas/quimiocinas, pero con el aumento de análisis disponibles para la detección, es probable que se determinen los marcadores que permitan una especificidad y sensibilidad del > 95 %. En conclusión, los inventores han demostrado que el uso de esputo en lugar de sangre aumenta significativamente la precisión diagnóstica de los ensayos de TB basados en el sistema inmunitario y reduce el tiempo para obtener resultados. Estos hallazgos son prometedores para el desarrollo futuro de un ensayo diagnóstico rápido de flujo lateral para la TB que sea aplicable para el uso en entornos de recursos limitados.

Sumario

La tuberculosis (TB) es un problema de salud pública importante en los países en desarrollo, con 9 millones de casos nuevos y 1,4 millones de muertes cada año. Un obstáculo importante para reducir la carga de TB es la ausencia de un ensayo diagnóstico rápido y preciso para su uso en clínicas sanitarias con una infraestructura mínima. Los inventores analizaron muestras de pacientes que presentaban síntomas que sugerían TB, pero antes de la confirmación. Tras la evaluación clínica y microbiológica, posteriormente se les diagnosticó con TB u otras enfermedades respiratorias (sin TB). Se evaluaron los biomarcadores del hospedador en esputo, saliva, suero y cultivos estimulados con antígeno de sangre entera para determinar el tipo de muestra óptimo y la combinación de biomarcadores para el diagnóstico de la TB. La estimulación nocturna de la sangre entera con ESAT-6/CFP10 (EC) o PPD generó altos niveles de citocinas; después de la estimulación con PPD, el mejor clasificador fue TGF- α con un ABC del 0,86 [IC del 95 % 0,73-1,0], una sensibilidad del 96,2 % [IC del 95 % 80,4-99,9], una especificidad del 80,0 % [IC del 95 % 56,3-94,3] y una relación de probabilidad de 4,8. Tras la estimulación de la EC, los niveles de TGF- α dieron como resultado una sensibilidad del 84,6 % [IC del 95 % 65,1-95,6] y una especificidad del 80 % [IC del 95 % 56,3-94,3]. La mejor clasificación se consiguió después de la estimulación con PPD con una combinación de CD40L, TGF α e IL10, proporcionando una clasificación correcta del 89 % de sujetos con TB o sin TB. Sin embargo, 24 horas de estimulación no es lo ideal para un ensayo diagnóstica "rápido". La saliva *ex vivo* tuvo niveles significativamente más altos de citocinas en comparación con el suero *ex vivo*, pero no pudo discriminar entre los grupos de pacientes. Los niveles séricos de IL7, IL-8 y G-CSF fueron todos significativamente más altos en los sujetos con TB en comparación con los sujetos sin TB ($p < 0,0001$, $p = 0,0014$ y $p = 0,0003$, respectivamente). Los inventores también analizaron los niveles de citocinas en la fracción soluble de esputo; que se usan para microbiología habitual y pueden obtenerse de la mayoría de los pacientes adultos con tuberculosis pulmonar. No se observaron diferencias significativas en los niveles de citocinas proinflamatorias (IFN- γ , IP-10, TNF- α), pero se observaron niveles significativamente más bajos de citocinas Th2 (IL-10 ($p = 0,0004$), IL-13 ($p = 0,0003$) y IL-15 ($p = 0,0221$) y citocinas innatas (IL-1 ra ($p = 0,0005$), VEGF (0,0301) y G-CSF ($p = 0,0041$)) y un mayor FGF ($p = 0,007$)

en el esputo de sujetos con TB en comparación con sujetos sin TB. Una combinación de IL-13, FGF e IFN- γ dio como resultado una clasificación correcta del 96 % de sujetos con TB y del 85 % de sujetos sin TB (del 90 % en general) independientemente del estado del VIH. La presente invención proporciona, por tanto, un ensayo rápido en el punto de atención para la TB.

5

Referencias:

10

1. WHO *Global Tuberculosis Report 2012*. Número de página de hechos de la OMS 104. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/factsheet_global.pdf.

15

2. Batz H-G, Cook GS, Reid SD. *Towards lab-free TB diagnostics. WHO-TDR 2011*. Se accede en: http://www.stoptb.org/wg/tb_hiv/assets/documents/MSF_Stop%20TB_Imperial_TAG_TowardsLabFreeTBDX_July%2011_Web2.pdf

20

3. Número de página de hechos de la tuberculosis de la OMS 104. Marzo de 2012. Se accede en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>

4. WHO *diagnostics evaluation series. Laboratorybased evaluation of 19 commercially available rapid diagnostic tests for tuberculosis*. 2008. Se accede en: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/diagnostic-evaluation-2.pdf>

25

5. Sutherland JS, Garba D, Fombah AE, MendyGomez A, Mendy FS, Antonio M, Townend J, Ideh RC, Corrah T, Ota MO. *Highly accurate diagnosis of pleural tuberculosis by immunological analysis of the pleural effusion. PLoS One* 2012; 7: e30324.

30

6. Dente FL, Carnevali S, Bartoli ML, Cianchetti S, Bacci E, Di Franco A, Vagaggini B, Paggiaro P. *Profiles of proinflammatory cytokines in sputum from different groups of severe asthmatic patients. Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 97: 312-320.

35

7. Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E, Zissler U, Rosewich M, Baer PC, Buhl R, Schmitt-Grohé S, Zielen S, Schubert R. *Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. Cytokine* 2010; 50: 152-157

40

8. Yang CT, Cambier CJ, Davis JM, Hall CJ, Crosier PS, Ramakrishnan L. *Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages. Cell Host Microbe* 2012; 12: 301-312.

9. Cormican U, Schey S, Milburn HJ. *G-CSF enables completion of tuberculosis therapy associated with iatrogenic neutropenia. Eur Respir J* 2004; 23: 649-650.

45

10. Dosanjh A. *The fibroblast growth factor pathway and its role in the pathogenesis of lung disease. J Interferon Cytokine Res* 2012; 32: 111-114.

11. Mariotti S, Sargentini V, Pardini M, Giannoni F, De Spirito M, Gagliardi MC, Greco E, Teloni R, Fraziano M, Nisini R. *Mycobacterium tuberculosis may escape helper T cell recognition by infecting human fibroblasts. Hum Immunol* 2013; 74: 722-729.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de la tuberculosis en un sujeto, que comprende:

- 5 (a) determinar un nivel de uno o más biomarcadores de proteínas del sistema inmunitario del hospedador en una muestra de esputo obtenida del sujeto, en el que los biomarcadores se seleccionan entre antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1 Ra), interleucina-10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13), interleucina-15 (IL-15), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); y
- 10 (b) comparar los niveles de los biomarcadores en la muestra de esputo con uno o más valores de referencia, comprendiendo dichos uno o más valores de referencia un nivel del biomarcador en una muestra de esputo de un sujeto que no padece tuberculosis; en el que una disminución del nivel de IL-1Ra, IL-10, IL-13, IL-15, G-CSF y/o VEGF en la muestra de esputo en comparación con los valores de referencia y/o un aumento del nivel de FGF en la muestra de esputo en comparación con el valor de referencia, son indicativos de la presencia de
- 15 tuberculosis en el sujeto.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los biomarcadores comprenden una o más citocinas seleccionadas entre IL-1Ra, IL-15, G-CSF y VEGF; en el que un nivel disminuido de biomarcador o biomarcadores en comparación con el o los valores de referencia es indicativo de la presencia de tuberculosis en el sujeto.

20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el biomarcador comprende FGF y un aumento del nivel del biomarcador en comparación con el valor de referencia es indicativo de la presencia de tuberculosis en el sujeto.

4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende

- 25 (a) determinar los niveles de los biomarcadores de proteínas del sistema inmunitario del hospedador IL-13 y FGF y el biomarcador de proteína del sistema inmunitario del hospedador adicional interferón- γ (IFN- γ) en una muestra de esputo obtenida del sujeto; y
- 30 (b) comparar los niveles de los biomarcadores en la muestra de esputo con uno o más valores de referencia;
- en el que una disminución del nivel de IL-13 e IFN- γ en la muestra de esputo en comparación con los valores de referencia y un aumento del nivel de FGF en la muestra de esputo en comparación con el valor de referencia, son indicativos de la presencia de tuberculosis en el sujeto.

35 5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que se sospecha que el sujeto padece una enfermedad pulmonar y el sujeto muestra uno o más síntomas seleccionados entre tos crónica, pérdida de peso y fiebre.

40 6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que los niveles de los biomarcadores se determinan mediante un inmunoensayo de flujo lateral, un ensayo de citocinas múltiple o una matriz de anticuerpos.

7. Un agente antituberculoso para su uso en el tratamiento de la tuberculosis en un sujeto, en el que la presencia de tuberculosis en el sujeto se ha determinado mediante un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

45 8. Un agente antituberculoso para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el agente antituberculoso comprende isoniazida, rifampicina, etambutol y/o pirazinamida; y/o en el que el tratamiento para la tuberculosis se administra durante al menos 2 meses, al menos 4 meses o al menos 6 meses.

50 9. Uso de un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral para detectar la tuberculosis en un sujeto, en el que el dispositivo se usa para determinar el nivel de uno o más biomarcadores de proteínas del sistema inmunitario del hospedador en una muestra de esputo obtenida del sujeto, en el que el dispositivo comprende uno o más reactivos adecuados para detectar uno o más biomarcadores de proteínas del sistema inmunitario del hospedador en una muestra de esputo obtenida del sujeto y en el que los biomarcadores se seleccionan entre IL-1Ra, IL-10, IL-13, IL-15, FGF, G-CSF y VEGF.

55 10. Un uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el dispositivo comprende uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más de los biomarcadores.

60 11. Un uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el dispositivo comprende uno o más reactivos adecuados para detectar los biomarcadores de proteínas del sistema inmunitario del hospedador IL-13 y FGF y el biomarcador de proteína del sistema inmunitario del hospedador adicional IFN- γ en una muestra de esputo obtenida del sujeto.

65 12. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el dispositivo comprende un anticuerpo marcado y un anticuerpo inmovilizado, uniéndose los anticuerpos marcados e inmovilizados cada uno a

un epítopo diferente en el biomarcador; opcionalmente en el que el anticuerpo inmovilizado se une a un material portador cromatográfico.

- 5 13. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en el que el dispositivo está en forma de varilla o tira reactiva; y/o en el que la presencia de tuberculosis en el sujeto se indica mediante una señal visible en una región de ensayo del dispositivo después de poner en contacto el dispositivo con la muestra de esputo.

Grupo	n total =	% de hombres	Edad (mediana[IIC])
TB	27	81	28[23-36]
Sin TB	52	49	27[22-33]
Sujetos utilizados por ensayo	TB	Sin TB	
Suero	25	52	
Saliva	20	42	
ESE	20	29	
Espuito	23	29	
Diagnósticos distintos de TB	n (%)		
EPOC	5 (8)		
Asma	2 (3)		
Neumonía	6 (10)		
EAR	39 (75)		

TB = con tuberculosis; sin TB = con otras enfermedades respiratorias; ESE = ensayo en sangre entera; EPOC = enfermedad pulmonar obstructiva crónica; EAR = infección del aparato respiratorio (indefinida); IIC = intervalo intercuartílico

Demografía de los pacientes

FIG. 1

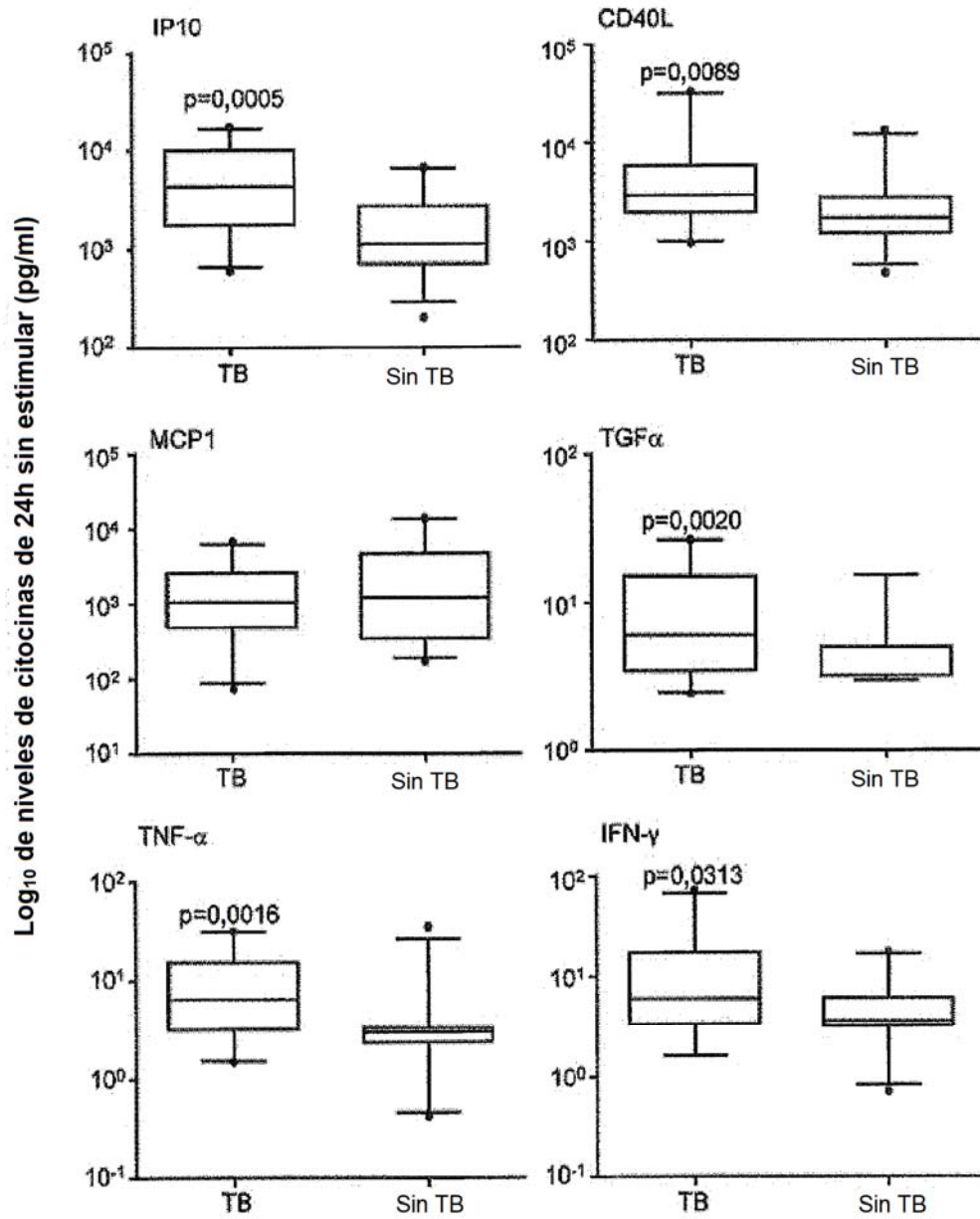


FIG. 2

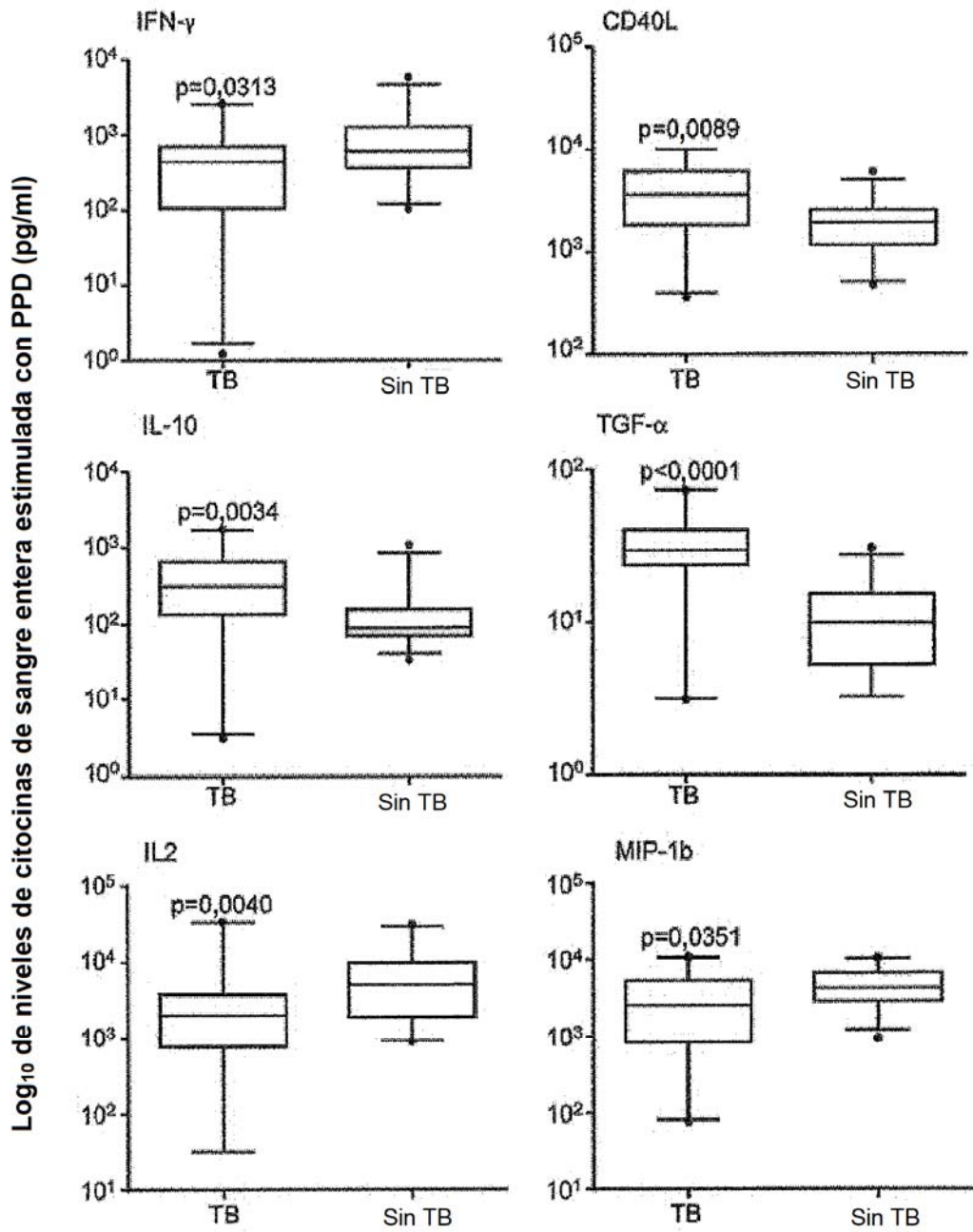


FIG. 3

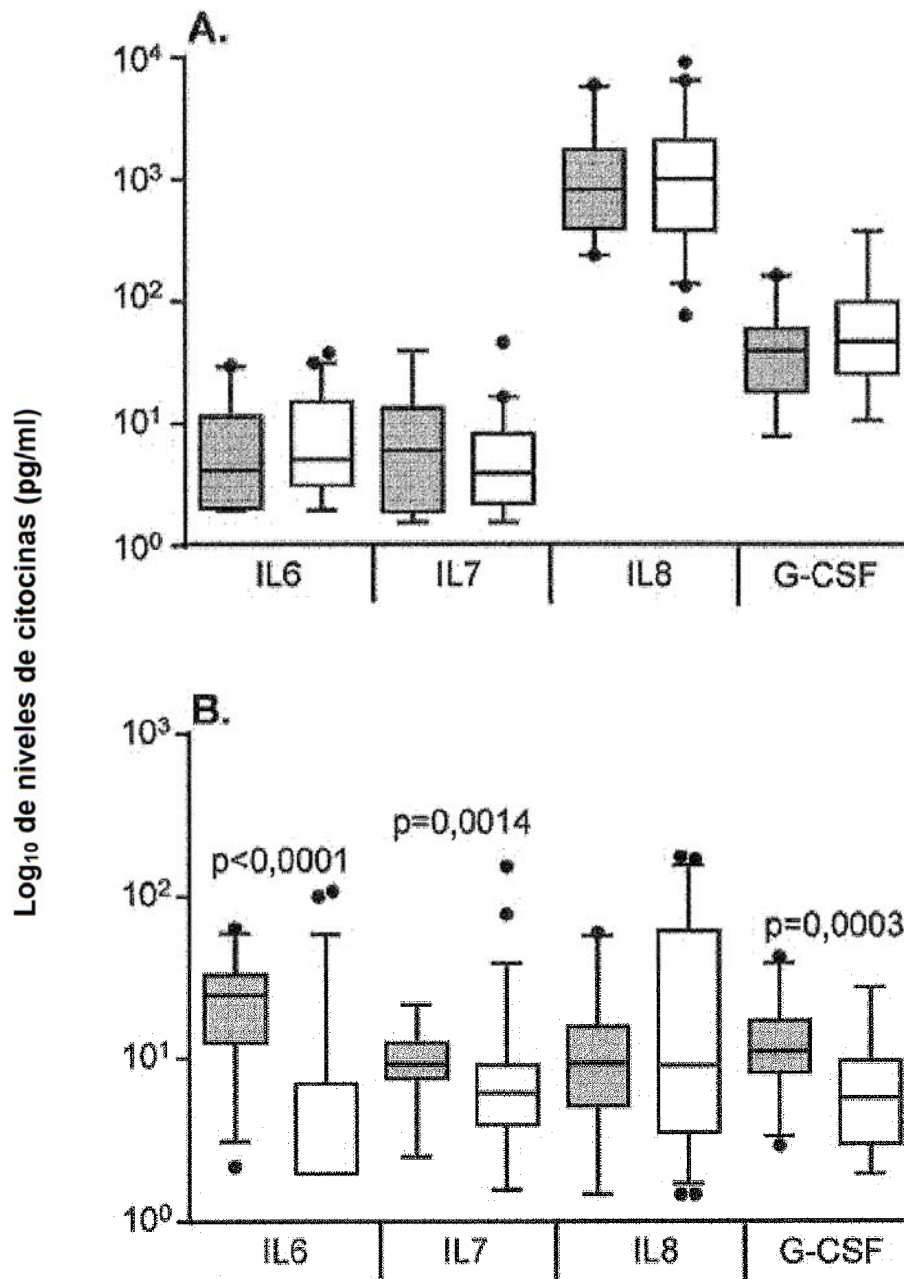


FIG. 4

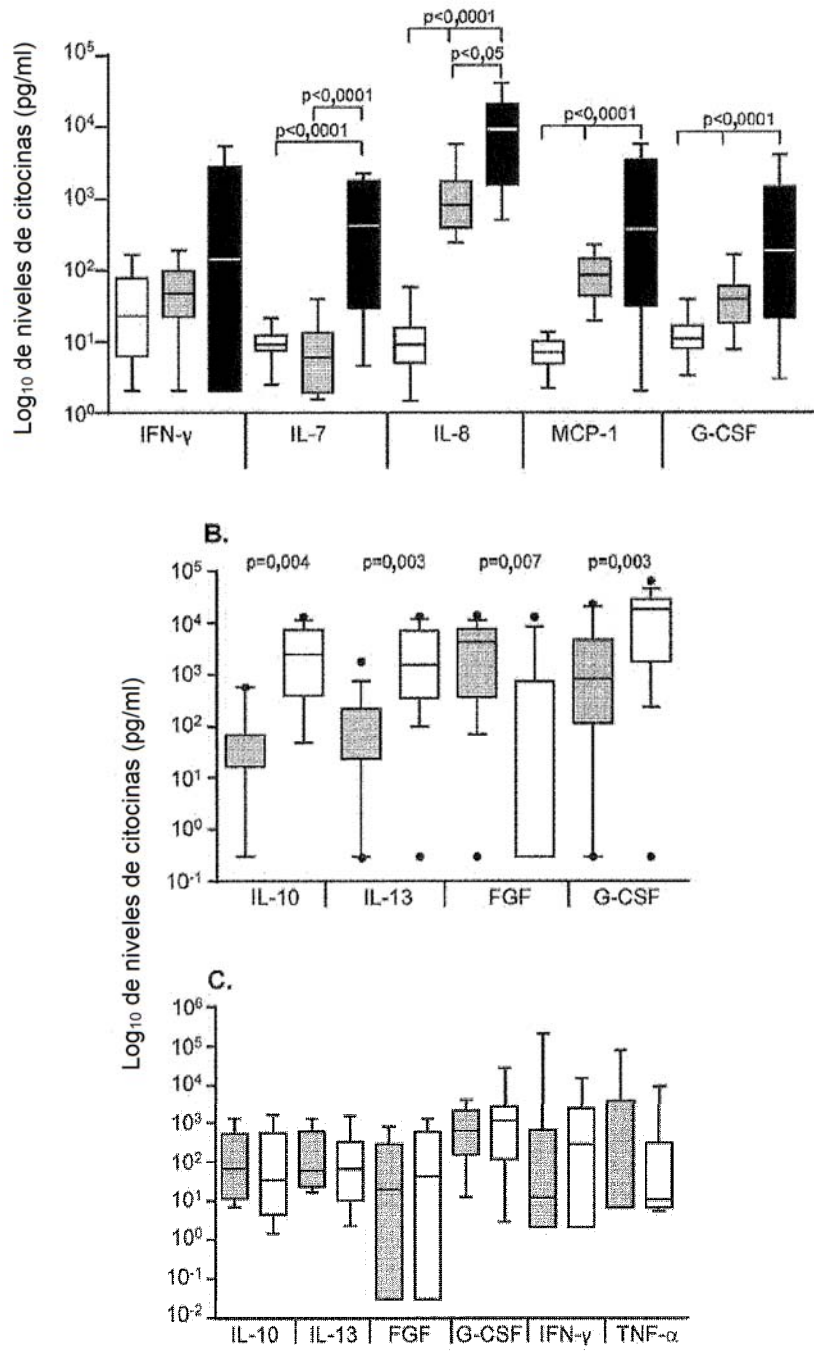
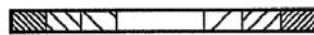


FIG. 5

	TB	Sin TB	Valor de p
IL1 β	2499	1577	ns
IL1ra	3458	11092	0,0005
IL2	0	0	ns
IL4	39	7	ns
IL6	41	98	ns
IL7	423	357	ns
IL8	9288	14629	ns
IL9	0	20	ns
IL10	7	210	0,0004
IL12	268	802	ns
IL13	25	155	0,0003
IL14	0	3	0,0221
IL17	0	0	ns
Eotaxina	0	0	ns
FGF	287	2	0,0071
G-CSF	189	1805	0,0041
IFN- γ	144	659	ns
IP10	5064	9164	ns
MCP-1	373	1186	ns
MIP-1 α	49	57	ns
MIP-1 β	702	473	ns
PDGF	44	150	ns
RANTES	35	0	ns
TNF- α	11	64	ns
VEGF	2811	12564	0,0301



Alto \longrightarrow Bajo

Niveles de analito (pg/ml)

FIG. 6