

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 438**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2010 PCT/AU2010/001717**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11075773**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2010 E 10838413 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2517012**

54 Título: **Un ensayo para medir la capacidad de respuesta inmune mediada por células**

30 Prioridad:

**23.12.2009 US 289880 P**

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

**18.12.2019**

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 y  
DE LAS HERAS, RACHEL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 735 438 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 para medir la capacidad de respuesta inmune mediada por células

**Campo**

5 La presente invención se refiere a un método para medir la actividad de una respuesta inmune mediada por células en un sujeto y al uso de uno o varios agentes que potencian el sistema inmune adaptativo y uno o varios agentes que potencian el sistema inmune innato en la preparación de un ensayo diagnóstico de la capacidad de respuesta inmune mediada por células. La presente invención permite la determinación de los efectos inmunosupresores de estados de enfermedad, agentes terapéuticos y contaminantes ambientales. El ensayo también es capaz de inte-  
10 grarse en la estructura de la patología para proporcionar un sistema informativo de diagnóstico y para facilitar la gestión clínica en el punto de atención.

**Antecedentes**

15 Los diagnósticos con base inmunológica proporcionan una herramienta importante para detectar una variedad de estados de enfermedad. Esto es especialmente el caso dada la especificidad de los componentes dentro del sistema inmunológico. A pesar de esa especificidad, los diagnósticos con base inmunológica no son siempre de forma necesaria lo suficientemente sensibles como para detectar niveles bajos de una actividad inmune adaptativa y/o innata, tal como una respuesta a una infección de bajo grado o en presencia de una infección persistente de bajo grado o en sujetos que presentan una inmunodeficiencia o cualquier forma de inmunosupresión. Existe una necesidad de desarrollar ensayos diagnósticos con una sensibilidad mejorada en relación con una capacidad de inmunorrespuesta  
20 mediada por células, debido al potencial inmune adaptativo e innato. Esto es particularmente el caso en sujetos expuestos o que presentan estados de enfermedad y en agentes que inducen o están asociados con la inmunosupresión.

25 Una forma de ensayos diagnósticos con base inmunológica implica la estimulación de los linfocitos T con antígenos o mitógenos, ya sea en un cultivo celular aislado o en un cultivo de sangre completa, seguida por la detección de moléculas efectoras como las citocinas producidas por los linfocitos T activados (también denominados linfocitos T efectoras). Las moléculas efectoras generalmente se detectan utilizando técnicas tales como inmunoensayos enzimáticos, análisis con perlas múltiples, ELISpot y citometría de flujo. Tales ensayos son útiles para detectar respues-  
tas de linfocitos T específicos de una enfermedad.

30 La aptitud para determinar la capacidad de respuesta inmune mediada por células de un sujeto es particularmente importante en el control de una inmunodeficiencia e inmunosupresión. La inmunodeficiencia se caracteriza por una capacidad reducida para desarrollar de manera efectiva una respuesta inmune. Esta respuesta comprometida o ausente puede ser el resultado de una inmunodeficiencia primaria o adquirida (secundaria).

35 Las inmunodeficiencias primarias (PIDs) se heredan genéticamente y se caracterizan por deficiencias en distintos componentes del sistema inmune adaptativo o innato (Hu y Gatti, *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 8(6):540-546, 2008). No obstante, la mayoría de las inmunodeficiencias son adquiridas (secundarias) y pueden estar inducidas por un agente patógeno, tal como ocurre con la infección por VIH; inducidas por fármacos, tal como en un tratamiento con inmunosupresores después de un trasplante de órganos; inducidas por estados de enfermedad, tal como puede ocurrir en el cáncer (por ejemplo, leucemia, linfoma); o inducidas por contaminantes ambientales y polucionantes.

40 La base molecular de la inmunodeficiencia es diversa, sin embargo, la inmunidad mediada por células tiene un papel clave en la mediación de muchas de las manifestaciones clínicas observadas. En la actualidad, los síndromes de inmunodeficiencia se diagnostican y se gestionan de manera *ad hoc* en función del agente causante.

45 Por ejemplo, la característica principal de una infección por VIH es la pérdida progresiva de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y una función inmunológica global deteriorada, incluyendo una respuesta inmune adaptativa específica del antígeno deteriorada frente a agentes patógenos como el citomegalovirus (CMV) y el virus de la hepatitis B (HBV) [Douek et al., *Annu. Rev. Med.* 60:471-84, 2009 y Chang et al., *J. Virol.* 83:7649-58, 2009]. Por lo tanto, el recuento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y la carga viral siguen siendo los marcadores indirectos clave en la infección por VIH y se han validado ampliamente como factores predictivos de una disfunción inmune y con una infección progresiva y de una reconstitución inmune después de una profilaxis (Hengel y Kovacs, *J. Infect. Dis.* 188(12):1791-3, 2003). Sin embargo, existen muchos casos en los que una enfermedad clínica no se correlaciona con el nivel de la función inmune según lo previsto por esos marcadores indirectos, particularmente cuando se desarrollan infecciones oportunistas en presen-  
50 cia de recuentos normales de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y cargas víricas bajas (Solomon et al., *J. Infect. Dis.* 187:1915-23, 2003).

55 Del mismo modo, realizar un seguimiento del estado de una inmunodeficiencia celular de pacientes que se han sometido a trasplantes de órganos sólidos (SOTs) y que están recibiendo medicamentos para suprimir su sistema inmune (inmunosupresores) como medida antirrechazo, también se maneja de una manera *ad hoc*. Por lo general, los niveles de fármacos inmunosupresores para pacientes se controlan al igual que los recuentos sanguíneos regulares y la incidencia de infecciones por injerto, nosocomiales o adquiridas en una comunidad (Schrem et al., *Dtsch Arztebl Int.* 106(9):148-156, 2009).

El problema inherente asociado con muchos de los marcadores actuales utilizados para realizar un seguimiento y definir una inmunodeficiencia asociada con estados de enfermedad, es la ausencia de inmunidad mediada por células. Se han desarrollado varias pruebas de la función de los linfocitos T que miden las respuestas linfoproliferativas frente a mitógenos como la fitohemaglutinina (PHA), el mitógeno de hierba carmín y la concanavalina A (ConA). Sin embargo, estas solo miden la capacidad funcional de los linfocitos T; un subconjunto de células implicadas en la inmunidad mediada por células. Es importante destacar que cada vez es más evidente que los mecanismos inmunes innatos contribuyen en gran medida a la defensa del hospedador, ya sea actuando solos o mejorando las respuestas específicas de los linfocitos T (Cooper et al., *Hematology*: 314-30. 2003). Por lo tanto, las respuestas funcionales de células inmunes innatas (linfocitos citolíticos naturales [NK]) y adaptativas (linfocitos T) forman conjuntamente un análisis más completo de la inmunidad mediada por células.

La capacidad para determinar la inmunidad mediada por células tiene una importancia clínica. Por ejemplo, más de 33 millones de adultos y niños están infectados con el VIH (Informe del 2008 sobre la epidemia mundial del SIDA, UNAIDS; ISBN 978 92 9 173711 6) y en la actualidad se realizan alrededor de 100.000 trasplantes de órganos sólidos por año en todo el mundo (Matesanz et al., *Transplant Proc.* 41(6):2297-301, 2009).

Una mala regulación inmune innata se ha visto implicada en la infección por VIH con un ensayo de IFN- $\gamma$  en sangre completa, descrito para realizar un seguimiento de la capacidad de respuesta inmune innata frente al compuesto agonista de TLR-7/8 (un compuesto de imidazoquinolina, R848) [Nowroozalizadeh et al., *Cytokine* 46:325-31, 2009]. Además, un dispositivo de diagnóstico que mide las respuestas de linfocitos T funcionales (Cylex ImmuKnow (marca registrada), tal y como se describe en el documento US 2003/0199006 A1) mide la producción de ATP a partir de linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulados con PHA (Kowalski et al., *J Immunotoxicol.* 4(3):225-32, 2007). Específicamente, el ensayo de Cylex ha demostrado una utilidad clínica en la configuración de los SOTs, de modo que los eventos adversos, tales como la infección y el rechazo, se pueden controlar adecuadamente.

Deetz CO et al. (*Infection and Immunity*, agosto de 2006, págs. 4505-4511) informan sobre la secreción de interferón gamma por linfocitos T V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 humanos después de una estimulación con anticuerpo contra el receptor de linfocitos T más el agonista del receptor 2 tipo toll, Pam<sub>3</sub>Cys.

Llewellyn-Smith N et al. (*Neurology* 1997; 48; pp. 810-816) informan sobre los efectos de un tratamiento con anticuerpos anti-CD3 sobre subconjuntos de linfocitos y la producción estimulada del factor de necrosis tumoral alfa.

Caron G et al. (*The Journal of Immunology*, 2005, 175: 1551-1557) informan sobre una estimulación directa de linfocitos T humanos a través de TLR5 y TLR7/8, mediante la cual la flagelina y R-484 regulan al alza la proliferación y la producción de IFN- $\gamma$  mediante linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria.

El documento de solicitud de patente internacional WO 2008/113119 A1 se refiere a métodos y kits para medir una respuesta inmune mediada por células en una muestra de sangre completa sin diluir.

El documento de solicitud de patente internacional WO 2010/009494 A1 el cual es un documento de conformidad con el art. 54(3) EPC 2000, se refiere a un método para medir la actividad de respuesta inmune mediada por células.

Existe una necesidad de desarrollar un ensayo que pueda evaluar el estado funcional combinado de una capacidad de respuesta inmune mediada por células, innata y adaptativa, en un sujeto y determinar los estados de enfermedad y los agentes que inducen una inmunosupresión.

### Compendio

El problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas; las realizaciones preferidas pueden tomarse de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un primer aspecto mediante un método para medir la actividad de la respuesta inmune mediada por células en un sujeto, comprendiendo dicho método poner en contacto una fuente de una muestra de linfocitos del sujeto con uno o varios agentes que potencian el sistema inmune adaptativo y uno o varios agentes que potencian el sistema inmune innato, en donde el uno o varios agentes que potencian el sistema inmune adaptativo se seleccionan a partir del grupo que consiste en anticuerpos anti-CD3, anticuerpos contra el complejo del receptor de linfocitos T, oligonucleótidos CpG, enterotoxina estafilocócica B (SEB), fitohemaglutinina (PHA), acetato de miristato de forbol (PMA), concanavalina A (ConA) y mitógeno de hierba carmín y en donde el uno o varios agentes que potencian el sistema inmune innato se seleccionan a partir del grupo que consiste en un ligando de TLR-3, un ligando de TLR-9 y lipomanoano, y medir la presencia o el aumento del nivel de una molécula efectora inmune procedente de células inmunes, en donde la presencia o el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del nivel de la capacidad de respuesta mediada por células del sujeto.

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un segundo aspecto mediante un método para medir la actividad de la respuesta inmune mediada por células en un sujeto, comprendiendo dicho método poner en contacto una fuente de una muestra de linfocitos del sujeto con uno o varios agentes que potencian el sistema inmune adaptativo y uno o varios agentes que potencian el sistema inmune innato y medir la presen-

- 5      cia o el aumento del nivel de una molécula efectora inmune procedente de células inmunes, en donde la presencia o el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del nivel de la capacidad de respuesta mediada por células del sujeto, en donde el uno o varios agentes que potencian el sistema inmune adaptativo estimula a través de medios independientes del receptor de linfocitos T y se selecciona a partir del grupo que consiste en acetato de miristato de forbol (PMA), concanavalina A (ConA) y mitógeno de hierba carmín.
- En una realización del primer y el segundo aspecto, el sujeto padece una enfermedad o una afección.
- En una realización del primer y el segundo aspecto, el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del grado de inmunosupresión inducida o asociada con el estado de enfermedad.
- 10     En una realización del primer y el segundo aspecto, la muestra es sangre completa sin diluir y en donde la muestra es sangre completa que comprende desde aproximadamente 10% a 100% en volumen de la muestra que se va a analizar, preferiblemente la sangre completa comprende desde aproximadamente 50% a 100% en volumen de la muestra que se va a analizar y más preferiblemente la sangre completa comprende desde aproximadamente 80% a 100% en volumen de la muestra que se va a analizar.
- En una realización del primer y el segundo aspecto, la sangre completa se incuba adicionalmente con un antígeno.
- 15     En una realización del primer y el segundo aspecto, el agente que potencia el sistema inmune adaptativo estimula a través de medios independientes del receptor de linfocitos T.
- En una realización del primer y el segundo aspecto, la molécula efectora inmune es una citocina.
- En una realización del primer y el segundo aspecto, los efectores inmunes se detectan con anticuerpos específicos de los mismos.
- 20     En una realización del primer y el segundo aspecto, el sujeto tiene una infección debida a un agente patógeno seleccionado a partir de especies de *Mycobacterium*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Streptococcus*, especies de *Borrelia*, *Escherichia coli*, especies de *Salmonella*, especies de *Clostridium*, especies de *Shigella*, especies de *Proteus*, especies de *Bacillus*, virus del herpes, virus de la hepatitis B o C y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o una enfermedad resultante de las mismas.
- 25     En una realización del primer y el segundo aspecto, el sujeto tiene un estado de enfermedad seleccionado a partir de alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, esclerosis múltiple con enfermedad de Addison autoinmune, enfermedad autoinmune de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, dermatitis celíaca, síndrome de fatiga crónica (CFIDS), desmielinización inflamatoria crónica, polineuropatía inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de crest, enfermedad de aglutinina fría, enfermedad de Crohn, dermatitis herpetiforme, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, diabetes dependiente de insulina (de tipo I), liquen plano, lupus, enfermedad de Meniere, enfermedad de tejido conjuntivo mixto, esclerosis múltiple, miastenia grave, miocarditis, pénfigo vulgar,
- 30     anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitíligo y enfermedad inflamatoria intestinal.
- 35     En una realización del primer y el segundo aspecto, el sujeto tiene un cáncer seleccionado a partir de protooncogén ABL1, cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenocístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnogenética, alopecia, sarcoma alveolar de partes blandas, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres de huesos, cáncer de intestino, glioma del tronco encefálico, 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 cutáneo de linfocitos T, dermatofibrosarcoma-protuberans, tumor desmoplásico de células pequeñas redondas, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma ocular, retinoblastoma, cáncer de trompa de Falopio, anemia de fanconi, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor gastrointestinal carcinóide, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, neoplasias hematológicas, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, virus del papiloma humano, mola hidatiforme, hipercalcemia, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, cáncer de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leiomiomas, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labios, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide maligno de riñón, meduloblastoma, mela-
- 40     En una realización del primer y el segundo aspecto, el sujeto tiene un cáncer seleccionado a partir de protooncogén ABL1, cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenocístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnogenética, alopecia, sarcoma alveolar de partes blandas, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres de huesos, cáncer de intestino, glioma del tronco encefálico, 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 cutáneo de linfocitos T, dermatofibrosarcoma-protuberans, tumor desmoplásico de células pequeñas redondas, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma ocular, retinoblastoma, cáncer de trompa de Falopio, anemia de fanconi, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor gastrointestinal carcinóide, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, neoplasias hematológicas, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, virus del papiloma humano, mola hidatiforme, hipercalcemia, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, cáncer de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leiomiomas, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labios, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide maligno de riñón, meduloblastoma, mela-
- 45     En una realización del primer y el segundo aspecto, el sujeto tiene un cáncer seleccionado a partir de protooncogén ABL1, cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenocístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnogenética, alopecia, sarcoma alveolar de partes blandas, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres de huesos, cáncer de intestino, glioma del tronco encefálico, 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 cutáneo de linfocitos T, dermatofibrosarcoma-protuberans, tumor desmoplásico de células pequeñas redondas, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma ocular, retinoblastoma, cáncer de trompa de Falopio, anemia de fanconi, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor gastrointestinal carcinóide, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, neoplasias hematológicas, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, virus del papiloma humano, mola hidatiforme, hipercalcemia, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, cáncer de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leiomiomas, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labios, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide maligno de riñón, meduloblastoma, mela-
- 50     En una realización del primer y el segundo aspecto, el sujeto tiene un cáncer seleccionado a partir de protooncogén ABL1, cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenocístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnogenética, alopecia, sarcoma alveolar de partes blandas, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres de huesos, cáncer de intestino, glioma del tronco encefálico, 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 cutáneo de linfocitos T, dermatofibrosarcoma-protuberans, tumor desmoplásico de células pequeñas redondas, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma ocular, retinoblastoma, cáncer de trompa de Falopio, anemia de fanconi, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor gastrointestinal carcinóide, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, neoplasias hematológicas, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, virus del papiloma humano, mola hidatiforme, hipercalcemia, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, cáncer de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leiomiomas, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labios, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide maligno de riñón, meduloblastoma, mela-
- 55     En una realización del primer y el segundo aspecto, el sujeto tiene un cáncer seleccionado a partir de protooncogén ABL1, cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenocístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnogenética, alopecia, sarcoma alveolar de partes blandas, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres de huesos, cáncer de intestino, glioma del tronco encefálico, 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 cutáneo de linfocitos T, dermatofibrosarcoma-protuberans, tumor desmoplásico de células pequeñas redondas, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma ocular, retinoblastoma, cáncer de trompa de Falopio, anemia de fanconi, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor gastrointestinal carcinóide, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, neoplasias hematológicas, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, virus del papiloma humano, mola hidatiforme, hipercalcemia, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, cáncer de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leiomiomas, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labios, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide maligno de riñón, meduloblastoma, mela-

5 noma, cáncer de células de merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, mieloma, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de rotura de nijmegen, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cánceres oculares, cáncer de esófago, cáncer de la  
 10 cavidad oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario por ostomía, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer de glándula parótida, cáncer de pene, 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 las glándulas salivares, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, tumores de la médula espinal, carcinoma de células escamosas (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer de testículo, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición (vejiga), cáncer de células de transición (renal-pelvis/uréter), cáncer trofoblástico, cáncer de uretra, cáncer del sistema urinario, uroplaquinas, sarcoma uterino, cáncer de útero, cáncer de vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms.

15 En una realización del primer y el segundo aspecto, el ligando de TLR-9 es oligodesoxinucleótido CpG.

En una realización del primer y el segundo aspecto, el ligando de TLR-3 es poli (I:C).

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un tercer aspecto mediante el uso de uno o varios agentes que potencian el sistema inmune adaptativo y uno o varios agentes que potencian el sistema inmune innato en la preparación de un ensayo diagnóstico de la capacidad de respuesta inmune mediada  
 20 por células a través del método de incubar agentes estimulantes innatos y adaptativos con una fuente que comprende linfocitos T y células NK y detectar la presencia o el aumento de moléculas efectoras, en donde el uno o varios agentes que potencian el sistema inmune adaptativo se seleccionan a partir del grupo que consiste en anticuerpos anti-CD3, anticuerpos contra el complejo del receptor de linfocitos T, oligonucleótidos CpG, enterotoxina B estafilocócica (SEB), fitohemaglutinina (PHA), acetato de miristato de forbol (PMA), concanavalina A (ConA) y mitógeno de hierba carmín, en donde el ensayo diagnóstico es para el diagnóstico de

25 una infección con un agente patógeno seleccionado a partir de especies de *Mycobacterium*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Streptococcus*, especies de *Borrelia*, *Escherichia coli*, especies de *Salmonella*, especies de *Clostridium*, especies de *Shigella*, especies de *Proteus*, especies de *Bacillus*, virus del herpes, virus de la hepatitis B o C y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o una enfermedad resultante de las mismas;

30 un estado de enfermedad seleccionado a partir de alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmune, esclerosis múltiple, enfermedad autoinmune de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, dermatitis celiaca, síndrome de fatiga crónica (CFIDS), desmielinización inflamatoria crónica, polineuropatía inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de crest,  
 35 enfermedad de aglutinina fría, enfermedad de Crohn, dermatitis herpetiforme, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, diabetes dependiente de insulina (de tipo I), líquen plano, lupus, enfermedad de Meniere, enfermedad de tejido conjuntivo mixto, 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, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitíligo y enfermedad inflamatoria intestinal; o

45 un cáncer seleccionado a partir de protooncogén ABL1, cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenocístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnógena, alopecia, sarcoma alveolar de partes blandas, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres de huesos, cáncer de intestino, glioma del tronco encefálico, 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 colorectales, linfoma cutáneo de linfocitos T, dermatofibrosarcoma-protuberans, tumor desmoplásico de células pequeñas redondas, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma ocular, retinoblastoma, cáncer de trompa de Falopio, anemia de fanconi, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor gastrointestinal carcinoide, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, neoplasias hematológicas, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, virus del papiloma humano, mola hidatiforme, hipercalcemia, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, cáncer de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe,  
 60 leiomiomasarcoma, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labios, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide

5 maligno de riñón, meduloblastoma, melanoma, cáncer de células de merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, mieloma, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de rotura de nijmegen, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cánceres oculares, cáncer de esófago, cáncer de la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario por ostomía, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer de glándula parótida, cáncer de pene, 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, rabdomiosarcoma, síndrome de Rothmund-Thomson, cáncer de las glándulas salivares, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, 10 cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, tumores de la médula espinal, carcinoma de células escamosas (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer de testículo, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición (vejiga), cáncer de células de transición (renal-pelvis/uréter), cáncer trofoblástico, cáncer de uretra, cáncer del sistema urinario, uroplaquinas, sarcoma uterino, cáncer de útero, cáncer de vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de 15 Wilms.

La presente invención, tal y como se define en las reivindicaciones, proporciona por tanto un método para evaluar el estado y el potencial de una inmunidad mediada por células en un sujeto. El método de la invención tal y como se define en las reivindicaciones se basa en la coestimulación de respuestas inmunes adaptativas e innatas. Esto proporciona una medición predictiva del potencial de inmunidad mediada por células, incluyendo el grado de cualquier inmunosupresión en un sujeto diana. En una realización de la invención tal y como se define en las reivindicaciones, se ponen en contacto células de sangre completa o una fracción de la misma con uno o varios agentes que estimulan tanto las respuestas inmunes adaptativas como las innatas en linfocitos. El nivel de capacidad de respuesta inmune mediada por células se determina midiendo la presencia o el nivel de una molécula efectora producida por las células inmunes. En una realización particular de la invención tal y como se define en las reivindicaciones, la sangre completa o una fracción de la misma comprende linfocitos T y células NK. Uno o varios agentes estimulan o potencian una respuesta inmune adaptativa a través de los linfocitos T y la inmunidad innata a través de las células NK. El ensayo, por lo tanto, mide el potencial inmune adaptativo e innato mediado por células de forma combinada.

La respuesta inmune combinada proporciona una mayor medida de la reactividad inmune mediada por células en comparación con la reactividad inmune adaptativa o innata medida de forma individual. Además, el ensayo se puede realizar utilizando pequeños volúmenes de sangre, tal como desde 1 µl hasta 1000 µl y, por lo tanto, el ensayo es apto para tomar una muestra mediante la punción de un dedo y de forma capilar. En este documento también se contemplan ensayos con un volumen más elevado, tal como de 1,5 ml a 200 ml, incluidos volúmenes de 5 ml, 10 ml y 20 ml.

La capacidad para determinar la inmunidad adaptativa e innata de forma combinada es importante, por ejemplo, para identificar estados de enfermedad y agentes terapéuticos y ambientales que inducen una inmunosupresión que podría conducir a un mayor riesgo de infecciones secundarias.

Por consiguiente, la presente invención tal y como se define en el método de las reivindicaciones para medir la actividad de una respuesta inmune mediada por células en un sujeto, comprende poner en contacto una fuente de una muestra de linfocitos procedente del sujeto con uno o varios agentes que potencian la inmunidad adaptativa e innata y medir el nivel de una molécula efectora inmune, producida por células inmunes, en donde el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del nivel de capacidad de inmunorrespuesta mediada por células del sujeto.

De acuerdo con la invención tal y como se define en las reivindicaciones, el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del nivel de la capacidad de inmunorrespuesta mediada por células del sujeto, en donde el nivel de la capacidad de inmunorrespuesta es indicativo de la presencia o ausencia o del nivel o el estadio de una enfermedad o afección seleccionada a partir de la lista que comprende una infección por un agente patógeno, una enfermedad autoinmune, un cáncer, una afección inflamatoria, una exposición a un agente tóxico, una exposición a un agente terapéutico y una inmunodeficiencia.

También se describe un ensayo para detectar la presencia, la ausencia, el nivel o el estadio de una enfermedad o una afección en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto una fuente de una muestra de linfocitos procedente del sujeto con uno o varios agentes que potencian la inmunidad adaptativa e innata y medir el aumento del nivel de una molécula efectora inmune procedente de células inmunes, en donde el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo de la enfermedad o la afección.

También se describe un método para realizar un seguimiento de una respuesta a un protocolo terapéutico para una enfermedad o una afección en un sujeto, en donde el método comprende poner en contacto una fuente de linfocitos procedentes del sujeto con un agente utilizado en el protocolo terapéutico y medir la presencia o el aumento del nivel de una molécula efectora inmune procedente de células inmunes en presencia de una o varias moléculas que potencian la inmunidad adaptativa e innata, en donde el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo de la eficacia del protocolo terapéutico.

La presente descripción también se refiere a un método para determinar si un agente induce inmunosupresión en un

sujeto, en donde el método comprende poner en contacto una fuente de linfocitos procedentes del sujeto después de la exposición al agente con uno o varios potenciadores que estimulan la inmunidad adaptativa e innata y medir la presencia y el nivel de una molécula efectora procedente de los linfocitos, en donde el nivel de la molécula efectora determina el nivel de inmunosupresión inducida por el agente.

5 El método de la presente invención, tal y como se define en las reivindicaciones, también se puede denominar un "ensayo". El ensayo de este documento es útil entre otros para evaluar la capacidad de respuesta inmune general de un sujeto o para detectar la capacidad de respuesta inmune frente a estados de enfermedad específicos, como una enfermedad autoinmune, enfermedad celíaca, cáncer, infección con un organismo o un agente patógeno, exposición a un agente tóxico o un medicamento y estados de inmunodeficiencia o inmunosupresión, tales como los inducidos por un estado de enfermedad. La fuente de linfocitos es convenientemente sangre completa, pero la presente invención contempla el uso de cualquier fuente de linfocitos, incluyendo muestras fraccionadas que comprenden linfocitos, así como muestras que se han sometido a aislamiento y/o agotamiento celular. Las micromuestras de sangre, como las obtenidas por pinchazos y métodos capilares, también forman parte de la presente invención. Las muestras comprenden al menos células T (linfocitos T) y células NK (linfocitos citolíticos naturales). La referencia a "células inmunes" incluye los linfocitos T.

Opcionalmente, se añade un azúcar simple como dextrosa o glucosa a la mezcla de reacción. La referencia a "sangre completa" incluye sangre completa sin diluir, así como sangre completa utilizada en un ensayo con un volumen desde aproximadamente el 10% a aproximadamente el 100% del volumen total del ensayo de la muestra (es decir, la mezcla de reacción), que incluye desde aproximadamente el 50% hasta aproximadamente el 100% y del 80% hasta el 100%. Los volúmenes del ensayo pueden variar desde 1  $\mu$ l a más de 1000  $\mu$ l, incluyendo de 1,5 ml a 200 ml, tal como de 5 ml a 20 ml.

Se puede usar un tipo de agente para potenciar la inmunidad adaptativa e innata o se pueden emplear juntos dos o más tipos de agentes. Un ejemplo incluye la coestimulación con un agonista de TCR y un agonista de TLR. Los linfocitos también pueden estar expuestos a un antígeno particular para medir la capacidad de respuesta inmune adaptativa e innata combinada de un sujeto inducida por un antígeno.

Los sujetos pueden ser animales humanos o no humanos. Por lo tanto, la presente invención tiene aplicaciones médicas humanas, veterinarias y ganaderas. Los seres humanos representan un objeto particularmente útil en la puesta en práctica de la presente invención.

La presente descripción también se refiere a un método para detectar si un estado de enfermedad está induciendo inmunosupresión en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto una fuente de linfocitos del sujeto con un estado de enfermedad con uno o varios agentes que potencian la inmunidad adaptativa e innata y medir la presencia o el nivel de una molécula efectora inmune de los linfocitos, en donde el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del grado de la inmunosupresión inducida o asociada con el estado de enfermedad.

También se describen kits y pruebas para la piel.

35 En una realización de la invención tal y como se define en las reivindicaciones, la muestra es sangre completa que se recoge en tubos de extracción que contienen los agentes o a los que se añaden los agentes para la incubación. En general, la sangre se conserva en presencia de heparina. La heparina puede estar en el tubo cuando se añade la sangre o se añade posteriormente. El uso de tubos de extracción de sangre es compatible con los sistemas de laboratorio automatizados convencionales y estos son susceptibles de un análisis en tomas de muestras a gran escala y de acceso aleatorio. Los tubos de extracción de sangre también minimizan los costes del manejo y reducen la exposición en un laboratorio a sangre completa y plasma y, por lo tanto, reducen el riesgo de que el personal de laboratorio entre en contacto con un agente patógeno como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB) o el virus de la hepatitis C (VHC). Además, el uso de los tubos de extracción para realizar la incubación hace que el ensayo sea más sensible que las placas de cultivo con 24 pocillos utilizadas anteriormente.

45 La presente invención, tal y como se define en las reivindicaciones, proporciona por lo tanto un ensayo inmune mediado por células mejorado que comprende, en una realización, el uso de un tubo de extracción, opcionalmente un azúcar sencillo como la dextrosa y la etapa de incubación con uno o varios agentes que potencian la inmunidad adaptativa e innata. La etapa de incubación tiene una duración generalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 horas, tal como 24 horas. Opcionalmente, también se puede añadir un antígeno.

50 Las moléculas efectoras inmunes son generalmente una citocina como, por ejemplo, IFN- $\gamma$ , una interleucina (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 o IL-13), un factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) o un factor estimulante de colonias de granulocitos o de granulocitos y macrófagos (G-CSF y GM-CSF, respectivamente). Otras moléculas efectoras se indican en la Tabla 6. La presencia o el nivel de la molécula efectora inmune se puede determinar a nivel de la propia molécula o en la medida en que se expresa un gen que codifica la molécula.

55 El ensayo de la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones, también se puede usar en un enfoque de medicina personalizada en el manejo de protocolos terapéuticos y/o como parte de una plataforma de la estructura patológica. Una plataforma de ese tipo se puede basar o no en la internet. Por lo tanto, también se proporciona un método comercial mediante el cual la sangre se extrae en tubos transportables que se analizan después

para determinar la capacidad de respuesta inmune mediada por células en una ubicación definida y los resultados se envían en forma de un informe electrónico a través de la estructura apropiada a un profesional sanitario.

Además, la capacidad de permitir que el ensayo se pueda realizar con pequeños volúmenes de sangre es útil para las poblaciones pediátricas, de ancianos y enfermas.

## 5 Breve descripción de las Figuras

Algunas figuras contienen representaciones o entidades en color. Las fotografías en color están disponibles previa solicitud al titular de la patente o en la Oficina de Patentes correspondiente. Se puede imponer una tarifa si se obtienen a partir de una Oficina de Patentes.

10 Las Figuras 1A a C son representaciones gráficas que muestran respuestas estimulantes únicas de IFN- $\gamma$  a partir de cultivos de sangre completa. Dispersión de una población de donantes sanos normales utilizando agentes estimulantes de TCR, mitógeno (A) y anticuerpo anti-CD3 (B) o agente estimulante de TLR, R848 (C).

15 Las Figuras 2A a C son representaciones gráficas que muestran la sinergia del anticuerpo anti-CD3 (agonista de TCR) con varios agonistas de TLR. (A) TLR-2; Pam3CSK4 y lipomanano, (B) TLR-4; LPS (lipopolisacárido) y (C) TLR-7/8; compuesto R848 (imidazoquinolina). Los números sobre la gráfica indican el número de veces del incremento de la respuesta de IFN- $\gamma$  de cultivos coestimulados con TLR/anticuerpo anti-CD3 frente a cultivos estimulados solo con anticuerpo anti-CD3.

20 La Figura 3 es una representación gráfica del uso de la sinergia de una coestimulación con TCR/TLR para establecer una respuesta de IFN- $\gamma$  valor de corte (umbral) en un individuo sano normal. Esto permite establecer un intervalo de referencia de una población sana, lo que da lugar a la capacidad de observar una disminución de la respuesta de IFN- $\gamma$  en un individuo inmunodeficiente. Por lo tanto, si la respuesta cae por debajo del umbral (valor de corte) de la población sana, se puede suponer una medida de la inmunosupresión debida a un tratamiento farmacológico o una enfermedad.

25 La Figura 4 es una representación gráfica que muestra la detección de múltiples analitos en plasma humano procedente de sangre completa tratada (agonistas de TCR + TLR) y no tratada (NIL). La sangre completa humana se trató mediante una estimulación con una combinación de anticuerpo anti-CD3 (agonista de TCR) y el agonista de TLR-7/8; R848 (imidazoquinolina). Diversas quimiocinas, citocinas y moléculas de señalización extracelular se encuentran solo en el plasma de sangre completa estimulada con un agonista de TCR y de TLR simultáneamente (barras azules; TCR + TLR). Varias otras moléculas están reguladas al alza en comparación con la sangre completa sin tratar (barras rojas; NIL).

30 La Figura 5 es una representación gráfica de la sinergia observada entre las respuestas de IFN- $\gamma$  con agentes estimulantes dobles (TCR + TLR) procedentes de cultivos de sangre completa, en comparación con una estimulación de la sangre completa con un agonista de TCR solo o con un agonista de TLR solo en una cohorte infectada con VIH y una sana normal. Las poblaciones del estudio incluyen (i) donantes positivos para VIH sin tratar (provenientes de Sudáfrica); y (ii) donantes sanos normales (provenientes de Australia). Las medianas de las poblaciones se muestran en la Tabla 7.

35 La Figura 6 es una representación gráfica de la correlación observada entre el nivel de respuesta de IFN- $\gamma$  y el recuento de linfocitos T CD4 observados en sangre completa estimulada con agonistas combinados (TCR + TLR) de una cohorte infectada con VIH.

40 La Figura 7 es una representación gráfica que muestra la estimulación de sangre completa con una combinación de agonistas de TCR y TLR, lo que permite la determinación de la concentración inhibitoria de la inmunosupresión en un donante determinado.

## Descripción detallada

45 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un elemento o un número entero o un grupo de elementos o de números enteros mencionados, pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero o grupo de elementos o de números enteros.

50 Tal y como se utiliza en la memoria descriptiva objeto, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen aspectos plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un linfocito T" incluye un solo linfocito T, así como dos o más linfocitos T; la referencia a "un agente" incluye un solo agente, así como dos o más agentes; la referencia a "la invención" incluye aspectos únicos o múltiples de una invención; etc. Los términos "células T" y "linfocitos T" se usan indistintamente en este documento. Una "célula inmune" incluye un linfocito T y células del sistema inmune innato como las células NK.

La referencia a un "agente", "reactivo", "molécula" y "compuesto" incluye entidades individuales y combinaciones de dos o más de esas entidades. Una "combinación" también incluye varias partes, tal como una composición de dos

partes en la que los agentes se proporcionan por separado y se usan o se administran por separado o se mezclan por adición antes de la administración. Por ejemplo, un envase para ensayo de partes múltiples puede tener dos o más agentes que potencian la inmunidad adaptativa e innata almacenados por separado. En una realización, los dos agentes son un agonista de TCR y un agonista de TLR. Por lo tanto, este aspecto de la presente invención incluye agentes secos y libres o inmovilizados en una pared del compartimento o un soporte sólido en un envase para ensayo. Una "combinación" también incluye una molécula de fusión o quimérica que comprende un agente estimulante de la inmunidad adaptativa y un agente estimulante de la inmunidad innata. El agente estimulante de la inmunidad adaptativa puede modular la inmunidad adaptativa mediante medios dependientes o independientes del receptor de linfocitos T. Un ejemplo de un agonista de TCR es el anticuerpo anti-CD3. Un agonista de TLR incluye un agonista de TLR-7/8 tal como R848 (imidazoquinolina).

La presente invención, tal y como se define en las reivindicaciones, se basa en parte en el aumento de la producción de moléculas efectoras procedentes de linfocitos expuestos a una potenciación de la inmunidad adaptativa e innata. Esto permite que con un ensayo más sensible se evalúe la capacidad de respuesta inmune mediada por células de un sujeto. La presente invención proporciona, por lo tanto, un ensayo para detectar, evaluar o realizar un seguimiento de otro modo de una respuesta mediada por células en un sujeto, midiendo la presencia o el nivel de moléculas efectoras procedentes de linfocitos T, estimuladas por un potenciador de la inmunidad adaptativa e innata. Los linfocitos se ponen en contacto con un agente que potencia la inmunidad adaptativa e innata. De acuerdo con la invención tal y como se define en las reivindicaciones, se emplean al menos dos agentes en donde al menos uno potencia la inmunidad adaptativa (a través de los linfocitos T) y al menos uno potencia la inmunidad innata (por ejemplo, a través de las células NK). En una alternativa, se emplea una molécula quimérica que comprende un agente estimulante de la inmunidad adaptativa y un agente estimulante de la inmunidad innata. El agente estimulante de la inmunidad adaptativa puede ser a través de medios dependientes o independientes del receptor de linfocitos T. La presente invención tal y como se define en las reivindicaciones, proporciona por lo tanto un medio para determinar la capacidad de respuesta de la inmunidad mediada por células en un sujeto y, a su vez, proporciona un medio para determinar si un estado de enfermedad o un agente induce o está asociado con la inmunosupresión. El método también permite el diagnóstico de enfermedades infecciosas, afecciones patológicas, la determinación del nivel de inmunocompetencia y la evaluación de la capacidad de respuesta inmune adaptativa e innata de células frente a agentes endógenos o exógenos, así como la evaluación de una exposición a un agente tóxico como el berilio u otros agentes tóxicos.

Por consiguiente, la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones, contempla un método para medir la actividad de respuesta inmune mediada por células en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto una fuente de linfocitos del sujeto con uno o varios agentes que potencian la inmunidad adaptativa e innata y medir la nivel de una molécula efectora inmune producida por células inmunes, en donde el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del nivel de la capacidad de respuesta inmune mediada por células del sujeto.

En una realización de la invención tal y como se define en las reivindicaciones, el método para medir la actividad de respuesta inmune mediada por células en un sujeto comprende poner en contacto una fuente de linfocitos del sujeto con uno o varios agentes que potencian la inmunidad adaptativa e innata y medir el aumento del nivel de una molécula efectora inmune procedente de las células inmunes, en donde el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del nivel de la capacidad de respuesta mediada por células del sujeto, en donde el nivel de la capacidad de respuesta es indicativo de la presencia o ausencia o del nivel o el estadio de una enfermedad o una afección seleccionada a partir de la lista que comprende una infección por un agente patógeno, una enfermedad autoinmune, un cáncer, una afección inflamatoria y una exposición a un agente tóxico.

En todavía otra realización de la invención tal y como se define en las reivindicaciones, el método comprende poner en contacto una fuente de linfocitos del sujeto con uno o varios agentes que potencian la inmunidad adaptativa e innata y medir el aumento del nivel de una molécula efectora inmune procedente de células inmunes, en donde el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del nivel de la capacidad de respuesta mediada por células y es indicativo de la presencia o ausencia o del nivel o el estadio de una enfermedad o una afección seleccionada a partir de la lista que comprende una infección por un agente patógeno, una enfermedad autoinmune, un cáncer, una afección inflamatoria y una exposición a un agente tóxico.

Se describe un ensayo para detectar la presencia, ausencia, nivel o estadio de una enfermedad o afección en un sujeto, en donde el método comprende poner en contacto una fuente de linfocitos procedente del sujeto, con uno o varios agentes que potencian la inmunidad adaptativa e innata y medir el aumento del nivel de una molécula efectora inmune procedente de las células inmunes, en donde el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo de la enfermedad o la afección.

La presente descripción describe además un método para determinar si un agente induce inmunosupresión en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto una fuente de linfocitos procedente del sujeto después de la exposición al agente, con uno o varios potenciadores que estimulan la inmunidad adaptativa e innata y medir la presencia y el nivel de una molécula efectora procedente de los linfocitos, en donde el nivel de la molécula efectora determina el nivel de inmunosupresión inducida por el agente.

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

En una realización de la presente invención, la muestra de sangre se estimula conjuntamente con un anticuerpo anti-CD3 como agonista de TCR y un agonista de TLR-7/8 tal como imidazoquinolina [R848]).

5 Por lo tanto, la presente invención, tal y como se define en las reivindicaciones, contempla un método para medir la actividad de respuesta inmune mediada por células en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto una fuente de linfocitos procedente del sujeto con un agonista de TCR y un agonista de TLR para potenciar la inmunidad adaptativa e innata y medir el nivel de una molécula efectora inmune producida por las células inmunes, en donde el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del nivel de la capacidad de inmunorrespuesta mediada por células del sujeto.

10 En una realización de la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones, el método es un método para medir la actividad de la respuesta inmune mediada por células en un sujeto, que comprende poner en contacto una fuente de linfocitos procedente del sujeto con un agonista de TCR y un agonista de TLR que potencian la inmunidad adaptativa e innata y medir el aumento del nivel de una molécula efectora inmune procedente de células inmunes, en donde el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del nivel de la capacidad de respuesta mediada por células del sujeto, en donde el nivel de la capacidad de respuesta es indicativo de la presencia o ausencia o del nivel o el estadio de una enfermedad o afección seleccionada a partir de la lista que comprende una infección por un agente patógeno, una enfermedad autoinmune, un cáncer, una afección inflamatoria y una exposición a un agente tóxico.

15 En otra realización de la invención tal y como se define en la reivindicación, el método es adecuado para detectar si un estado de enfermedad está induciendo inmunosupresión en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto una fuente de linfocitos procedente del sujeto con un estado de enfermedad, con uno o varios agentes que potencian la inmunidad adaptativa e innata y medir la presencia o el nivel de una molécula efectora inmune procedente de los linfocitos, en donde el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del grado de inmunosupresión inducida o asociada con el estado de enfermedad.

20 También se proporciona un uso tal y como se define en las reivindicaciones, para uno o varios agentes que potencian la inmunidad adaptativa e innata en la preparación de un ensayo diagnóstico de la capacidad de respuesta inmune mediada por células mediante el método de incubar linfocitos con una o varias moléculas que potencian el sistema inmune adaptativo e innato y detectar la presencia o el aumento de una molécula efectora.

25 Este uso incluye el uso para detectar o realizar un seguimiento de la presencia, ausencia, nivel o estadio de una enfermedad o afección, tal como una infección por un agente patógeno, una enfermedad autoinmune, un cáncer, una afección inflamatoria y/o una exposición a un medicamento o a un agente tóxico, como berilio u otro agente tóxico ambiental. La medición de "una molécula efectora inmune" incluye la medición de uno o varios tipos diferentes de moléculas.

30 La referencia a la potenciación de la inmunidad adaptativa e innata incluye la estimulación de la inmunidad dependiente y/o independiente de los receptores de linfocitos T y la inmunidad dependiente de los receptores de tipo Toll (TLR), como la mediada por las células NK. Por "células inmunes" se entiende que incluyen "linfocitos T". También se puede añadir un agente adicional para modular la actividad de los linfocitos T reguladores (linfocitos T-reg). Este último incluye inhibir la función supresora de los linfocitos T-reg. Los agentes que modulan los linfocitos T-reg incluidos en el presente documento, incluyen un ligando de CD25; un oligonucleótido sentido o antisentido para material genético que codifica JAK1 o TYK2; un anticuerpo neutralizante; un oligonucleótido que contiene CpG; un oligonucleótido que actúa como un agente modulador de TLR; y otros agentes moduladores de TLR.

35 En una realización particular de la invención tal y como se define en las reivindicaciones, los linfocitos T-reg son células supresoras de la respuesta inmune cuya actividad está inhibida.

40 En consecuencia, la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones, incluye además un método para medir la actividad de una respuesta inmune mediada por células en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto una fuente de linfocitos T reguladores procedentes del sujeto con un agente seleccionado a partir de (i) un inhibidor de los linfocitos T reguladores supresores; y (ii) un activador de células aumentadoras inmunes o un subconjunto de las mismas; y además poner en contacto los linfocitos T con uno o varios agentes que potencian la inmunidad adaptativa e innata y medir el aumento del nivel de una molécula efectora inmune procedente de las células inmunes, en donde el nivel de la molécula inmune procedente es indicativo del nivel de la capacidad de respuesta mediada por células del sujeto.

45 Ejemplos de inhibidores o moduladores de la función T-reg incluyen ligandos de CD25 como, por ejemplo pero sin limitarse a, un anticuerpo policlonal o monoclonal contra CD25 o un fragmento del mismo que se une a 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 ácidos nucleicos y moléculas sentido o antisentido dirigidos al ARNm o ADN (es decir, material genético) que codifican la Janus Tiro-sina Cinasa 1 (JAK1) o la Tiro-sina Cinasa 2 (TYK2) o inhibidores de moléculas pequeñas de proteínas JAK1 o TYK2. La referencia a "moléculas pequeñas" incluye nuevos receptores de antígenos de inmunoglobulinas (IgNARs) como se describen en el documento de publicación de patente internacional nº WO 2005/118629. Aún otros ejemplos

adicionales de agentes estimulantes de agentes adecuados, tales como moléculas CpG que actúan a través de receptores de tipo Toll (TLRs) y/u otros mecanismos. Por lo tanto, los oligonucleótidos que contienen CpG y un oligonucleótido que actúa como un agente modulador de TLR, también forman parte de la presente invención.

5 Se puede usar un solo tipo de agente o se pueden emplear dos o más tipos de agentes para modular los linfocitos T-reg. Por ejemplo, el ensayo se puede realizar 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 antisentido o un sentido de JAK1/TYK2 y un agente modulador de TLR. Alternativamente, solo se emplea un tipo de agente. En otra alternativa, se usa un oligonucleótido que comprende CpG y un agente modulador de TLR.

10 De acuerdo con los diversos aspectos de la presente invención, los linfocitos/células inmunes también se pueden exponer a un antígeno para medir la capacidad de inmunorrespuesta adaptativa e innata inducida por un antígeno.

15 La referencia a un "sujeto" incluye una especie humana o no humana que incluye primates, animales de la ganadería (por ejemplo, ovejas, vacas, cerdos, caballos, burros, cabras), animales de laboratorio (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, cobayas, hámsteres), animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos), especies aviares (por ejemplo, aves de corral, pájaros), reptiles y anfibios. La presente invención se puede aplicar, por lo tanto, en medicina humana así como en aplicaciones para la ganadería y la veterinaria y animales silvestres, lo que incluye el sector de las carreras de caballos, perros y camellos. Por ejemplo, el ensayo de la presente invención se puede realizar rutinariamente en caballos antes y/o después de un esfuerzo intenso (como una carrera) para detectar una evidencia de hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio (EIPH). Todos los caballos muestran algún tipo de EIPH hasta  
20 cierto grado durante el ejercicio. Sin embargo, las formas subclínicas de EIPH pueden ser difíciles de detectar.

La referencia a un ser humano incluye poblaciones particulares de seres humanos, tales como pediátricas, de ancianos y enfermos, así como cohortes o poblaciones particulares de una etnia particular.

25 En otra realización de la invención tal y como se define en las reivindicaciones, el sujeto es un ser humano y el ensayo de respuesta inmune mediada por células se usa en la detección de la capacidad de respuesta frente a microorganismos patógenos, virus y parásitos, la posibilidad de desarrollo o vigilancia de afecciones autoinmunes, enfermedad celiaca, vigilancia de la respuesta de un sujeto frente a una exposición oncológica y para determinar la presencia de cualquier inmunodeficiencia o inmunosupresión. Esto último puede ocurrir, por ejemplo, debido a ciertos medicamentos que incluyen diversos agentes quimioterapéuticos. Alternativamente, la exposición a sustancias tóxicas y contaminantes ambientales.

30 Las moléculas efectoras inmunes pueden ser cualquiera dentro de una variedad de moléculas que se producen como respuesta a una activación o estimulación celular a través de un antígeno. Aunque un interferón (IFN) tal como el IFN- $\gamma$ , es una molécula efectora inmune particularmente útil, otras incluyen una serie de citocinas como las interleucinas (IL), por ej., IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 o IL-13, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), un factor estimulante de colonias (CSF) tal como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G)-CSF o de granulocitos y macrófagos (GM)-CSF, entre muchos otros como el complemento o componentes de la ruta del complemento. Otras moléculas efectoras que se pueden perfilar incluyen las indicadas en la  
35 Tabla 6.

40 Ejemplos de agonistas del receptor de linfocitos T incluyen PHA, enterotoxina B estafilocócica (SEB), oligonucleótidos CpG, anticuerpos contra el complejo de receptor de linfocitos T y anticuerpos anti-CD3. Los ejemplos de agentes estimulantes de la respuesta inmune adaptativa, independientes del receptor de linfocitos T incluyen PMA y ConA. Los agonistas de TLR incluyen Pam3CSK4 (ligando de TLR-2), lipomanano (ligando de TLR-2), poli(I:C) - (ligando de TLR-3), lipopolisacárido (ligando de TLR-4), un compuesto de imidazoquinolina tal como R848 (ligando de TLR-7/8) y oligodesoxinucleótidos CpG (ligando de TLR-9). En términos de la selección de un agonista de TLR, en orden decreciente, los agonistas se seleccionan entre agonistas de TLR-7/8 > TLR-4 > TLR-3 > TLR-2.

45 Una "molécula CpG" significa un oligonucleótido que comprende una secuencia o motivo CpG. La presente invención se extiende a cualquier modulador de la función del receptor de tipo Toll (TLR) u otro aspecto del sistema inmune.

50 El ensayo de la presente invención, tal y como se define en las reivindicaciones, permite la detección de la presencia o ausencia o del nivel o el estadio de una enfermedad o afección en un sujeto, tal como una infección por un agente patógeno, una enfermedad autoinmune, cáncer, exposición a un agente inflamatorio, exposición a un medicamento, exposición a un agente tóxico como el berilio u otro agente tóxico o contaminante y la inmunodeficiencia o inmunosupresión, como la inducida por un estado de enfermedad.

55 El o los agentes para la inmunidad adaptativa e innata pueden estar de forma libre en un recipiente para reactivos o se pueden inmovilizar sobre un soporte sólido, tal como una perla o un lado o el fondo de un recipiente de reacción. El agente o los agentes también pueden estar en forma seca que se reconstituye antes o durante el uso. De manera similar, si se incluye un antígeno, el antígeno puede estar de forma libre o inmovilizado en un recipiente de reacción tal como el propio recipiente o una perla u otro soporte sólido.

En una realización de la invención tal y como se define en las reivindicaciones, la muestra recogida del sujeto generalmente se deposita en un tubo de extracción de sangre. Un tubo de extracción de sangre incluye un tubo de extracción de sangre u otro recipiente similar. Convenientemente, cuando la muestra es sangre completa, el tubo de extracción de sangre se hepariniza. Alternativamente, la heparina se añade al tubo después de que se extraiga la sangre. A pesar de que se contempla particularmente la sangre completa y es la muestra más conveniente, la presente invención se extiende a otras muestras que contienen células inmunes tales como fluido linfático, fluido cerebral, fluido tisular y fluido respiratorio que incluyen fluido nasal y pulmonar, así como muestras que han sufrido un agotamiento celular. La referencia a "sangre completa" incluye sangre completa que no se ha diluido, como con un cultivo de tejidos, medio, reactivos, excipientes, etc. En una realización, la expresión "sangre completa" incluye una muestra de ensayo (es decir, una mezcla de reacción) que comprende al menos 10% en volumen de sangre completa. La expresión "al menos 10% en volumen" incluye volúmenes de sangre 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 del ensayo de la mezcla de reacción. Se pueden añadir agentes adicionales, tales como medios de cultivo, enzimas, excipientes, antígeno y similares, sin apartarse de la muestra que comprende "sangre completa".

También se pueden usar pequeños volúmenes de sangre, por ejemplo, de 1 µl a 1000 µl. Los ejemplos incluyen 5 µl, 10 µl, 20 µl, 50 µl, 100 µl y 500 µl, así como fracciones intermedias. Por lo tanto, los volúmenes de la muestra incluyen desde aproximadamente 1 µl a aproximadamente 200 ml, incluyendo 1 ml, 5 ml, 10 ml y 20 ml.

El uso de tubos de extracción de sangre es compatible con los sistemas de laboratorio automatizados convencionales y estos son susceptibles de un análisis en tomas de muestras a gran escala y de acceso directo. Los tubos de extracción de sangre también minimizan los costes de manejo y reducen la exposición en un laboratorio a sangre completa y plasma y, por lo tanto, reducen el riesgo de que el personal de laboratorio entre en contacto con un agente patógeno como el VIH o el virus de la hepatitis B (VHB) o el virus de la hepatitis C (VHC).

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

Las células del sistema inmune mediado por células pierden la capacidad de desarrollar una respuesta inmune en la sangre completa después de largos períodos de tiempo posteriores a la extracción de sangre del sujeto, y las respuestas sin intervención se reducen considerablemente de forma frecuente o están ausentes 24 horas después de la extracción de sangre. La reducción de la mano de obra y la necesidad de artículos de plástico especializados permiten realizar una estimulación inmune mediada por células con antígenos en los puntos de atención, como consultorios médicos, clínicas, centros ambulatorios y clínicas veterinarias o en granjas. Una vez que se completa la estimulación con el antígeno, ya no existe el requerimiento de células de nuevo aporte y activas. El IFN-γ y otras citocinas o moléculas efectoras inmunes son estables en el plasma y, por lo tanto, la muestra se puede almacenar o enviar sin condiciones especiales o requisitos de rapidez.

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

La capacidad para medir la inmunidad mediada por células es importante para evaluar la capacidad de un sujeto para responder a una infección debida a un agente patógeno como un microorganismo o un virus o parásito, para desarrollar una respuesta autoinmune tal como en la diabetes autoinmune o para proteger contra cánceres u otras afecciones oncológicas o para detectar una afección inflamatoria o para detectar la exposición o la sensibilidad de un sujeto frente a un agente tóxico tal como el berilio. El ensayo descrito en el presente documento también permite la detección de estados de enfermedad que conducen a una inmunosupresión o una inmunosupresión inducida por medicamentos. En consecuencia, la referencia a "medir una respuesta inmune mediada por células en un sujeto" incluye y abarca el diagnóstico inmune de enfermedades infecciosas y autoinmunes, un marcador de la inmunocompetencia, así como un marcador de enfermedades inflamatorias, cáncer y agentes tóxicos. Es importante destacar que se determina la capacidad de respuesta inmune adaptativa e innata combinadas. Además, la capacidad para utilizar pequeños volúmenes de sangre permite realizar ensayos fácilmente, por ejemplo, en las poblaciones pediátricas, de ancianos y enfermos.

En una realización de la invención tal y como se define en las reivindicaciones, los estados de enfermedad que conducen a una inmunosupresión incluyen una infección crónica y cáncer. Los medicamentos que pueden conducir a una inmunosupresión incluyen aquellos utilizados para tratar la artritis reumatoide, el cáncer y la enfermedad inflamatoria intestinal.

Los agentes patógenos o infecciosos incluyen bacterias, parásitos y virus. Ejemplos de bacterias incluyen microorganismos gram-positivos y gram-negativos, tales como especies de *Mycobacterium*, 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*, especies de *Borrelia*, entre otras. *Mycobacterium tuberculosis* es una diana particularmente útil, así como afecciones derivadas de una infección por *M. tuberculosis*, tal como la tuberculosis (TB). Ejemplos de virus incluyen el virus de la hepatitis (virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C), el virus del herpes y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), así como enfermedades derivadas de los mismos. Los parásitos incluyen especies de *Plasmodium*, tiña, parásitos del hígado y similares. Otros agentes patógenos incluyen células eucariotas tales como levaduras y hongos.

Las enfermedades autoinmunes contempladas en este documento para una detección incluyen entre otras, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, esclerosis múltiple con enfermedad de Addison autoinmune, enfermedad autoinmune de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, dermatitis celíaca, síndrome de fatiga crónica (CFIDS), desmielinización inflamatoria crónica, polineuropatía inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de crest, enfermedad de aglutinina fría, enfermedad de Crohn, dermatitis herpetiforme, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, diabetes dependiente de insulina (de tipo I), liquen plano, lupus, enfermedad de Meniere, enfermedad de tejido conjuntivo mixto, 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, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis y vitiligo.

En general, es importante evaluar la capacidad de respuesta potencial o real mediada por células en sujetos expuestos a estas entidades infecciosas. El método de la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones, también se puede usar para detectar la presencia o ausencia de estas afecciones, así como el nivel o el estadio de un proceso de enfermedad.

Otros estados de enfermedad que pueden conducir a una inmunosupresión incluyen estados de enfermedad inflamatoria.

Ejemplos de estados de enfermedad inflamatoria contemplados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquellas enfermedades y trastornos que dan lugar a una respuesta de enrojecimiento, hinchazón, dolor y una sensación de calor en ciertas áreas que se entiende que protegen tejidos afectados por una lesión o enfermedad. Las enfermedades inflamatorias que se pueden tratar utilizando los métodos de la presente invención incluyen, sin limitarse a, acné, angina de pecho, artritis, neumonía por aspiración, enfermedad, empiema, gastroenteritis, inflamación, gripe intestinal, NEC, enterocolitis necrotizante, enfermedad inflamatoria de la pelvis, faringitis, PID, pleuritis, ardor de garganta, enrojecimiento, rubor, dolor de garganta, dolor de estómago e infecciones del 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 invención se extiende a la detección de EIPH en caballos y diversas afecciones en animales tales como la enfermedad tumoral facial en el diablo de Tasmania.

La terapia del cáncer también depende en cierta medida de la inmunidad mediada por células y el cáncer mismo o los fármacos utilizados para tratar el cáncer pueden conducir a una inmunosupresión. Los cánceres contemplados en este documento incluyen: un grupo de enfermedades y trastornos que se caracterizan por un crecimiento celular incontrolado (por ejemplo, la formación de un tumor) sin ninguna diferenciación de esas células en células especializadas y diferentes. Esas enfermedades y trastornos incluyen protooncogén ABL1, cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenocístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloide agnógena, alopecia, sarcoma alveolar de partes blandas, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres de huesos, cáncer de intestino, glioma del tronco encefálico, 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 cutáneo de linfocitos T, dermatofibrosarcoma-protuberans, tumor desmoplásico de células pequeñas redondas, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma ocular, retinoblastoma, cáncer de trompa de Falopio, anemia de fanconi, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor gastrointestinal carcinóide, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, neoplasias hematológicas, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, virus del papiloma humano, mola hidatiforme, hipercalcemia, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, cáncer de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leiomiomas, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labios, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide maligno de riñón, meduloblastoma, melanoma, cáncer de células de merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndrome

mes mielodisplásicos, mieloma, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de rotura de nijmegen, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cánceres oculares, cáncer de esófago, cáncer de la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario por ostomía, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer de paratiroides, 5 cáncer de glándula parótida, cáncer de pene, 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, rabdomiosarcoma, síndrome de Rothmund-Thomson, cáncer de las glándulas salivares, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, tumores de la médula espinal, carcinoma de células escamosas (piel), 10 cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer de testículo, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición (vejiga), cáncer de células de transición (renal-pelvis/uréter), cáncer trofoblástico, cáncer de uretra, cáncer del sistema urinario, uroplaquinas, sarcoma uterino, cáncer de útero, cáncer de vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms.

Tal y como se ha indicado anteriormente, las células inmunes linfocíticas también pueden estar expuestas a un antígeno para medir la inmunidad adaptativa e innata combinada inducida por un antígeno. 15

La detección de las moléculas efectoras inmunes se puede medir a niveles de proteína o de ácido nucleico. En consecuencia, la referencia a una "presencia o nivel" de la molécula efectora inmune incluye datos directos e indirectos. Por ejemplo, los niveles altos de ARNm de citocina son datos indirectos que muestran niveles elevados de la citocina. 20

Los ligandos de los efectores inmunes son particularmente útiles para detectar y/o cuantificar esas moléculas. Los anticuerpos contra los efectores inmunes son particularmente útiles. Las técnicas para los ensayos contemplados en el presente documento son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, radioinmunoensayos, ensayos de tipo sándwich, ELISA y ELISpot. La referencia a "anticuerpos" incluye partes de anticuerpos, anticuerpos mamiferizados (por ejemplo, humanizados), anticuerpos desinmunizados, anticuerpos recombinantes o sintéticos y anticuerpos 25 híbridos y de cadena sencilla. Para las pruebas cutáneas, en humanos, los anticuerpos humanizados o desinmunizados se contemplan particularmente en este documento para detectar las moléculas efectoras.

Tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales se pueden obtener mediante una inmunización con las moléculas efectoras inmunes o fragmentos antigénicos de las mismas y cualquiera de los dos tipos es utilizable en inmunoensayos. Los métodos para obtener ambos tipos de sueros son bien conocidos en la técnica. Los sueros policlonales son menos preferidos, pero se preparan de manera relativamente fácil poniendo una inyección a un animal de laboratorio adecuado con una cantidad eficaz del efector inmune, o una parte antigénica del mismo, reco- 30 giendo suero del animal y aislando sueros específicos mediante cualquiera de las técnicas conocidas de inmunoadsorción. Aunque los anticuerpos producidos por este método son utilizables en prácticamente cualquier tipo de inmunoensayo, generalmente son menos preferidos debido a la heterogeneidad potencial del producto.

El uso de anticuerpos monoclonales en un inmunoensayo es particularmente útil debido a la capacidad para producirlos en grandes cantidades y la homogeneidad del producto. La preparación de líneas celulares de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales obtenidos mediante una fusión de una línea celular inmortal y linfocitos sensibilizados contra la preparación inmunogénica, se puede realizar mediante técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica. 35

Otro aspecto de la presente descripción contempla, por lo tanto, un método para detectar una molécula efectora inmune en una muestra que comprende linfocitos procedentes de un sujeto, en donde el método comprende poner en contacto la muestra o una parte alícuota de la muestra con un anticuerpo específico para la molécula efectora inmune o un fragmento antigénico de la misma durante un tiempo y en condiciones suficientes para que se forme un complejo de anticuerpo-efector, y después detectar el complejo en el que se genera la molécula efectora inmune 40 después de una incubación de los linfocitos con uno o varios agentes que potencian los sistemas inmunes adaptativos e innatos.

Una "muestra" incluye sangre completa o una fracción de la misma que comprende linfocitos. Este método incluye micromatrices, macromatrices y nanomatrices en soportes sólidos planos o esféricos. Una micromatriz o una ma- 45 cromatriz es útil. Una "muestra" también incluye una muestra de volumen bajo de aproximadamente 1 µl a 1000 µl, incluyendo 5 µl, 10 µl, 20 µl, 50 µl y 100 µl.

Existe una amplia gama de técnicas de inmunoensayo disponibles, como se puede observar haciendo referencia a los documentos de patente de EE.UU. nº 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. 50

A continuación se describe un tipo de ensayo. Un anticuerpo sin marcar se inmoviliza sobre un sustrato sólido y la muestra que se va a analizar para detectar las moléculas efectoras inmunes (por ejemplo, citocinas) se pone en contacto con la molécula unida. Después de un período de incubación adecuado, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo de anticuerpo-molécula efectora inmune, se añade un segundo anticuerpo específico de la molécula efectora, marcado con una molécula informadora capaz de producir una señal detectable, y después se añade y se incuba durante un tiempo suficiente para la formación de otro complejo de 55

anticuerpo-efector-anticuerpo marcado. Cualquier material que no haya reaccionado se elimina por lavado, y la presencia de la molécula efectora se determina mediante la observación de una señal producida por la molécula informadora. Los resultados pueden ser cualitativos, mediante una simple observación de la señal visible, o se pueden cuantificar comparando con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de antígeno. Esta técnica generalizada es bien conocida por los expertos en la técnica, igual que lo sería cualquiera entre una serie de variaciones.

En estos ensayos, un primer anticuerpo que tiene especificidad hacia los efectores inmunes listos se une de forma covalente o pasiva a una superficie sólida. La superficie sólida es generalmente de vidrio o un polímero, en donde los polímeros empleados más comúnmente son celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, perlas, esferas, discos de microplacas o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son bien conocidos en la técnica y generalmente consisten en una unión reticulando de forma covalente o una adsorción física, el complejo de polímero-anticuerpo se lava como preparación para la muestra de la prueba. Luego se añade una parte alícuota de la muestra que se va a analizar al complejo en fase sólida y se incuba durante un período de tiempo suficiente (por ejemplo, 2-120 minutos o cuando sea más conveniente, durante una noche) y en condiciones adecuadas (por ejemplo, de aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C) para permitir la unión de cualquier subunidad presente en el anticuerpo. Después del período de incubación, la fase sólida de la subunidad de anticuerpo se lava y se seca, y se incuba con un segundo anticuerpo específico de una porción de la molécula efectora. El segundo anticuerpo se liga a una molécula informadora que se usa para indicar la unión del segundo anticuerpo a la molécula efectora.

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

Por "molécula informadora" tal y como se usa en la presente memoria descriptiva, se entiende una molécula que por su naturaleza química, proporciona una señal analíticamente identificable que permite la detección de un anticuerpo unido a antígeno. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa. Las moléculas informadoras usadas más comúnmente en este tipo de ensayo son enzimas, fluoróforos o moléculas que contienen radionucleidos (es decir, radioisótopos) y moléculas quimioluminiscentes. En la Tabla 1 se proporcionan ejemplos de fluoróforos adecuados. En el caso de un inmunoensayo enzimático, una enzima se conjuga con el segundo anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído o peryodato. Sin embargo, como se reconocerá fácilmente, existe una amplia variedad de técnicas de conjugación diferentes, que son muy asequibles para el experto en la materia. Las enzimas de uso común incluyen la peroxidasa de rábano picante, la glucosa oxidasa, la beta-galactosidasa y la fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos que se van a emplear con las enzimas específicas se eligen generalmente para la producción, después de una hidrólisis con la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen la fosfatasa alcalina y la peroxidasa. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, que producen un producto fluorescente en lugar de los sustratos cromogénicos mencionados anteriormente. En todos los casos, el anticuerpo marcado con enzima se añade al primer complejo de anticuerpo-antígeno, se deja que se una y luego el exceso de reactivo se elimina por lavado. Después, una solución que contiene el sustrato apropiado se añade al complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El sustrato reaccionará con la enzima ligada al segundo anticuerpo, produciendo una señal visual cualitativa, que se puede cuantificar adicionalmente, generalmente de forma espectrofotométrica, para proporcionar una indicación de la cantidad de antígeno que estaba presente en la muestra. De nuevo, la presente invención se extiende a un ensayo sustancialmente simultáneo.

Alternativamente, los compuestos fluorescentes, tales como la fluoresceína y la rodamina, se pueden acoplar químicamente a los anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa mediante iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía luminosa, lo que induce un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de la luz en un color característico detectable visualmente con un microscopio óptico. Se permite que el anticuerpo marcado de forma fluorescente se una al primer complejo de anticuerpo-antígeno. Después de eliminar por lavado el reactivo no unido, el complejo terciario restante se expone entonces a la luz de la longitud de onda apropiada, la fluorescencia observada indica la presencia del antígeno de interés. Las técnicas de inmunofluorescencia y de inmunoensayo enzimático están ambas muy bien establecidas en la técnica y se prefieren particularmente para el presente método. Sin embargo, también se pueden emplear otras moléculas informadoras, tales como radioisótopos, moléculas quimioluminiscentes o bioluminiscentes.

Existe una serie de otros sistemas de detección que se pueden emplear, incluyendo el oro coloidal, y todos esos sistemas de detección están incluidos en la presente invención.

La presente descripción también contempla ensayos genéticos tales como los que implican un análisis con PCR para detectar productos de expresión del ARN de una secuencia genética que codifica un efector inmune.

En un ejemplo, la PCR se realiza utilizando parejas de cebadores, uno o ambos de los cuales generalmente está marcado con la misma molécula informadora o una diferente capaz de proporcionar una señal distinguible. El uso de fluoróforos es particularmente útil en la puesta en práctica de la presente invención. Se pueden seleccionar ejemplos

de fluoróforos adecuados a partir de la lista que figura en la Tabla 1. Otros marcadores incluyen luminiscencia y fosforescencia, así como colorantes infrarrojos. Estos colorantes o fluoróforos también se pueden usar como moléculas informadoras para anticuerpos.

Tabla 1

<i>Lista de fluoróforos adecuados</i>		
Sonda	Ex <sup>1</sup> (nm)	Em <sup>2</sup> (nm)
Sondas reactivas y conjugadas		
Hidroxycumarina	325	386
Aminocumarina	350	455
Metoxicumarina	360	410
Azul cascada	375; 400	423
Amarillo lucifer	425	528
NBD	466	539
R-Ficoeritrina (PE)	480; 565	578
Conjugados de PE-Cy5	480; 565; 650	670
Conjugados de PE-Cy7	480; 565; 743	767
Conjugados de APC-Cy7	650; 755	767
Rojo 613	480; 565	613
Fluoresceína	495	519
FluorX	494	520
BODIPY-FL	503	512
TRITC	547	574
X-Rodamina	570	576
Lisamina Rodamina B	570	590
PerCP	490	675
Rojo de texas	589	615
Alofocianina (APC)	650	660
TruRed	490, 675	695
Alexa Flúor 350	346	445
Alexa Flúor 430	430	545
Alexa Flúor 488	494	517
Alexa Flúor 532	530	555
Alexa Flúor 546	556	573
Alexa Flúor 555	556	573

ES 2 735 438 T3

Alexa Flúor 568	578	603
Alexa Flúor 594	590	617
Alexa Flúor 633	621	639
Alexa Flúor 647	650	688
Alexa Flúor 660	663	690
Alexa Flúor 680	679	702
Alexa Flúor 700	696	719
Alexa Flúor 750	752	779
Cy2	489	506
Cy3	(512); 550	570; (615)
Cy3,5	581	596; (640)
Cy5	(625); 650	670
Cy5,5	675	694
Cy7	743	767
Sondas de ácido nucleico		
Hoeschst 33342	343	483
DAPI	345	455
Hoechst 33258	345	478
Azul SYTOX	431	480
Cromomicina A3	445	575
Mitramicina	445	575
YOYO-1	491	509
Verde SYTOX	504	523
Naranja SYTOX	547	570
Bromuro de etidio	493	620
7-AAD	546	647
Naranja de acridina	503	530/640
TOTO-1, TO-PRO-1	509	533
Naranja de tiazol	510	530
Yoduro de propidio (PI)	536	617
TOTO-3, TO-PRO-3	642	661
LDS 751	543; 590	712; 607
Proteínas fluorescentes		

Y66F	360	508
Y66H	360	442
EBFP	380	440
Tipo silvestre	396, 475	50, 503
GFPuv	385	508
ECFP	434	477
Y66W	436	485
S65A	471	504
S65C	479	507
S65L	484	510
S65T	488	511
EGFP	489	508
EYFP	514	527
DsRed	558	583
Otras sondas		
Monoclorobimano	380	461
Calceína	496	517
<sup>1</sup> Ex: Longitud de onda de excitación máxima (nm) <sup>2</sup> Em: longitud de onda de emisión máxima (nm)		

Cualquier método adecuado para analizar la emisión de fluorescencia está incluido en la presente invención. A este respecto, la presente invención contempla técnicas que incluyen, pero no se limitan a, espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo de 2 fotones y 3 fotones como se describe, por ejemplo, en Lakowicz y col., *Biophys. J.* 72:567, 1997, formación de imágenes fluorescentes en tiempo real como se describe, por ejemplo, en Eriksson et al., *Biophys. J.* 2:64, 1993 y transferencia de energía por resonancia fluorescente como se describe, por ejemplo, en Youvan et al., *Biotechnology et alia* 3:1-18, 1997.

La luminiscencia y la fosforescencia pueden ser el resultado, respectivamente, de un marcador luminiscente o fosforescente adecuado, tal y como se conoce en la técnica. Cualquier medio óptico para la identificación de un marcador de ese tipo se puede utilizar a este respecto.

La radiación infrarroja puede ser el resultado de un colorante infrarrojo adecuado. Los colorantes infrarrojos ejemplares que se pueden emplear en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Lewis et al., *Dyes Pigm.* 42(2):197, 1999, Tawa et al., *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 488 [Electrical, Optical and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials IV], 885-890, Daneshvar et al., *J. Immunol. Methods* 226(1-2):119-128, 1999, Rapaport et al., *Appl. Phys. Lett.* 74(3):329-331, 1999 y Durig et al., *J. Raman Spectrosc.* 24(5):281-285, 1993. Se puede emplear cualquier método espectroscópico infrarrojo adecuado para cuestionar el colorante infrarrojo. Por ejemplo, la espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier como, por ejemplo, la descrita por Rahman et al., *J. Org. Chem.* 63:6196, 1998, se puede utilizar en ese sentido.

De forma adecuada, una dispersión electromagnética puede dar como resultado la difracción, reflexión, polarización o refracción de la radiación electromagnética incidente, incluida la luz y los rayos X. Esa dispersión se puede usar para cuantificar el nivel de ARNm o el nivel de proteína.

La citometría de flujo es particularmente útil para analizar la emisión de fluoróforos.

Tal y como se conoce en la técnica, la citometría de flujo es una técnica de alto rendimiento que consiste en analizar rápidamente las características físicas y químicas de partículas (por ejemplo, ARNm, ADN o proteínas marcadas) a medida que pasan a través de la trayectoria de uno o varios rayos láser mientras están suspendidas en una corrien-

te fluida. A medida que cada partícula intercepta el rayo láser, la luz dispersada y la luz fluorescente emitida por cada célula o partícula se detecta y se registra utilizando cualquier algoritmo de seguimiento adecuado como, por ejemplo, se describe a continuación.

5 Un citómetro de flujo moderno puede realizar estas tareas hasta con 100.000 células/partículas.s<sup>-1</sup>. Mediante el uso de una matriz óptica de filtros y espejos dicróicos, se pueden separar y detectar simultáneamente diferentes longitudes de onda de la luz fluorescente. Además, se pueden usar varios láseres con diferentes longitudes de onda de excitación. Por lo tanto, se puede usar una variedad de fluoróforos para dirigirse y examinar, por ejemplo, diferentes efectores inmunes dentro de una muestra o efectores inmunes de múltiples sujetos.

10 Los citómetros de flujo adecuados que se pueden usar en los métodos de la presente invención incluyen aquellos que miden de cinco a nueve parámetros ópticos (consúltese la Tabla 2) utilizando un único láser de excitación, comúnmente un láser de ion argón enfriado con aire que funciona a 15 mW en su línea espectral de 488 nm. Los citómetros de flujo más avanzados son capaces de emplear múltiples láseres de excitación, tal como un láser HeNe (633 nm) o un láser HeCd (325 nm) además del láser de ion argón (488 o 514 nm).

Tabla 2

<i>Parámetros ópticos ejemplares que se pueden medir con un citómetro de flujo</i>			
Parámetro	Acrónimo	Ángulo de detección del haz de láser incidente	Longitud de onda (nm)
Luz dispersada frontalmente	FS	2-5°	488*
Luz dispersada lateralmente	SS	90°	488*
Fluorescencia "verde"	FL1	90°	510-540 <sup>†</sup>
Fluorescencia "amarilla"	FL2	90°	560-580 <sup>†</sup>
Fluorescencia "roja"	FL3	90°	>650 <sup>#</sup>
* utilizando un láser de excitación de 488 nm			
<sup>†</sup> ancho del filtro de paso de banda			
<sup>#</sup> filtro de paso largo			

15 Por ejemplo, Biggs et al., *Cytometry* 36:36-45, 1999 han construido un citómetro de flujo de 11 parámetros utilizando tres láseres de excitación y han demostrado el uso de nueve fluoróforos distinguibles además de las mediciones de dispersión frontal y lateral para fines de inmunofenotipificado (es decir, clasificación) de partículas. La selección de los parámetros que se pueden usar adecuadamente depende en gran medida de los coeficientes de extinción, los rendimientos cuánticos y la cantidad de solapamiento espectral entre todos los fluoróforos (Malemed et al., *Flow cytometry and sorting*, 2ª edición, Nueva York, Wiley-Liss, 1990). Se entenderá que la presente invención no está restringida a ningún citómetro de flujo en particular ni a ningún conjunto particular de parámetros. A este respecto, la invención también contempla el uso en lugar de un citómetro de flujo convencional, un citómetro de flujo microfabricado como, por ejemplo, el descrito por Fu et al., *Nature Biotechnology* 17:1109-1111, 1999.

20 El ensayo de la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones, puede estar automatizado o semiautomatizado para un escrutinio de alto rendimiento o para un escrutinio de varios efectores inmunes procedentes de un sujeto. La automatización está controlada convenientemente por un programa informático.

25 La presente invención tal y como se define en las reivindicaciones, contempla además, por lo tanto, sistemas basados en la internet y no basados en la internet en los que un servidor para clientes u otra plataforma estructural proporciona datos sobre la capacidad de inmunorrespuesta mediada por células de un sujeto a un procesador central que analiza y compara con un control y, opcionalmente, considera otra información tal como la edad del paciente, el sexo, el peso y otras afecciones médicas y luego proporciona un informe como, por ejemplo, un factor de riesgo para la gravedad o la progresión de una enfermedad o el estado o un índice de probabilidad de desarrollo de una enfermedad. Por lo tanto, también se proporciona un método comercial mediante el cual la sangre se extrae en tubos transportables que se analizan después para determinar la capacidad de inmunorrespuesta mediada por células en una ubicación definida y los resultados se envían en forma de un informe electrónico a través de un servidor para clientes u otra plataforma estructural a un profesional sanitario.

Por lo tanto, el programa y el equipo informático basados en el conocimiento también forman parte de la presente invención. Esto facilita la atención clínica para determinar si un estado de enfermedad que incluye infección, cáncer inflamación o un medicamento o un agente tóxico, está induciendo o se asocia con una inmunosupresión.

5 En particular, los ensayos de la presente invención tal y como se definen en las reivindicaciones, se pueden usar en estructuras o plataformas basadas en el conocimiento, existentes o desarrolladas recientemente, asociadas con servicios de patología. Por ejemplo, los resultados de los ensayos se transmiten a través de una red de comunicaciones (por ejemplo, internet) o una conexión telefónica a un sistema de procesamiento en el que se almacena un algoritmo y se utiliza para generar un valor de probabilidad posterior previsto que se traduce en el índice de capacidad de inmunorrespuesta mediada por células o inmunosupresión, el cual se envía después a un usuario final en forma de un informe diagnóstico o predictivo. Este informe también puede formar la base de una gestión de atención clínica y medicina personalizada.

10 El ensayo, por lo tanto, puede estar en forma de un kit o un sistema informático que comprende los reactivos necesarios para detectar la concentración de la molécula efectora inmune, después de una exposición de los linfocitos a uno o varios agentes que potencian la inmunidad adaptativa e innata, y el programa y/o el equipo informático para facilitar la determinación y la transmisión de informes a un médico clínico.

15 En una realización de la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones, se contempla un método que permite a un usuario determinar el estado de la capacidad de inmunorrespuesta mediada por células de un sujeto, en donde el método incluye:

20 (a) recibir datos en forma de niveles o concentraciones de una molécula efectora inmune que, en relación con un control, proporcionan una correlación con el estado de la capacidad de inmunorrespuesta mediada por células del usuario a través de una red de comunicaciones, de la molécula efectora inmune medida después de la exposición de los linfocitos a uno o varios agentes que potencian las respuestas inmunes adaptativas e innatas;

(b) procesar los datos del sujeto a través de un análisis univariado o multivariado para proporcionar un valor de la capacidad de inmunorrespuesta;

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

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

La referencia a un análisis "univariado" o "multivariado" incluye un algoritmo que realiza la función de análisis univariado o multivariado.

30 Convenientemente, el método generalmente incluye de forma adicional:

(a) que el usuario determine los datos utilizando una estación final remota; y

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

La estación base puede incluir sistemas de procesamiento primero y segundo, en cuyo caso el método puede incluir:

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

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

(c) hacer que el primer sistema de procesamiento realice la función de análisis univariado o multivariado para generar el valor de la capacidad de inmunorrespuesta mediado por células.

El método también puede incluir:

40 (a) transferir los resultados de la función de análisis univariado o multivariado al primer sistema de procesamiento; y

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

En ese caso, el método también incluye al menos uno de:

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

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

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

(a) consultar la base de datos para obtener al menos datos predeterminados seleccionados o acceso a la función de análisis univariado o multivariado de la base de datos; y

(b) comparar los datos predeterminados seleccionados con los datos del sujeto o generar un índice de probabilidad previsto de un nivel de la capacidad de inmunorrespuesta celular o inmunosupresión.

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

El método también puede incluir que el usuario determine los datos utilizando una matriz segura, en donde la matriz segura de elementos es capaz de determinar el nivel de la molécula efectora inmune y tiene una serie de características, ubicada cada una en la o las respectivas posiciones en el código respectivo. En ese caso, el método generalmente incluye hacer que la estación base:

10

(a) determine el código a partir de los datos;

(b) determine un formato que indique la posición de cada característica en la matriz; y

(c) determine los valores de los parámetros de acuerdo con el formato determinado y los datos.

El método también puede incluir hacer que la estación base:

15 (a) determine la información para el pago, en donde la información del pago representa la provisión de un pago por parte del usuario; y

(b) realice la comparación como respuesta a la determinación de la información de un pago.

En una realización de la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones, también se proporciona una estación base para determinar el estado de un sujeto con respecto a una capacidad de inmunorrespuesta mediada por células o inmunosupresión, incluyendo la estación base:

20

(a) un método de almacenamiento;

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

25 (c) recibir datos del sujeto a partir del usuario a través de una red de comunicaciones, en donde los datos incluyen los niveles de una molécula efectora inmune, en donde el nivel de la molécula efectora en relación con un control proporciona una correlación con el estado de la capacidad de inmunorrespuesta mediada por células, en donde la molécula efectora inmune se determina después de la exposición de los linfocitos a uno o varios agentes que potencian el sistema inmune adaptativo e innato;

(d) realizar una función algorítmica que incluye comparar los datos con unos datos predeterminados;

30 (e) determinar el estado del sujeto de acuerdo con los resultados de la función algorítmica, incluyendo la comparación; y

(c) generar una indicación del estado del sujeto para el usuario a través de la red de comunicaciones.

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

El sistema de procesamiento puede incluir:

35 a) un primer sistema de tratamiento adaptado para:

(i) recibir los datos; y

(ii) determinar el estado del sujeto de acuerdo con los resultados de la función de análisis univariado o multivariado, incluyendo la comparación de los datos; y

(b) un segundo sistema de procesamiento adaptado para:

40 (i) recibir los datos desde el sistema de procesamiento;

(ii) realizar la función de análisis univariado o multivariado, incluyendo la comparación; y

(iii) transferir los resultados al primer sistema de procesamiento.

La estación base incluye generalmente:

(a) un primer servidor de seguridad para acoplar el primer sistema de procesamiento a la red de comunicacio-

nes; y

(b) un segundo servidor de seguridad para acoplar los sistemas de procesamiento primero y segundo.

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

5 De acuerdo con esa realización, los niveles de la molécula efectora inmune se pueden escrutar solos o en combinación con otros biomarcadores o indicadores de una enfermedad. Un nivel "alterado" significa un incremento o un aumento o una disminución o reducción de las concentraciones de la molécula efectora inmune.

10 La determinación de las concentraciones o los niveles de la molécula efectora inmune permite el establecimiento de una norma de diagnóstico basada en las concentraciones en relación con los controles. Alternativamente, la norma de diagnóstico se basa en la aplicación de un algoritmo estadístico y de aprendizaje automático. Ese algoritmo utiliza las relaciones entre la molécula efectora y un estado de enfermedad observado en los datos de capacitación (con una enfermedad o un estado de capacidad de respuesta inmune mediada por células conocidos) para deducir relaciones que luego se emplean para predecir el estado de los sujetos con un estado desconocido. Se puede emplear un algoritmo que proporcione un índice de probabilidad de que un sujeto tenga un cierto nivel de capacidad de inmunorrespuesta mediada por células y/o un estado de enfermedad. El algoritmo realiza una función de análisis univariado o multivariado.

20 Por lo tanto, la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones, incluye en una realización una norma de diagnóstico basada en la aplicación de algoritmos estadísticos y de aprendizaje automático. Un algoritmo de ese tipo utiliza las relaciones entre la molécula efectora inmune y el nivel de capacidad de inmunorrespuesta mediada por células o inmunosupresión observado en los datos de capacitación (con un estado inmune conocido) para deducir relaciones que luego se usan para predecir el estado de pacientes con un estado inmune desconocido. Los profesionales expertos en la técnica del análisis de datos reconocen que se pueden emplear muchas formas diferentes para deducir relaciones en los datos de capacitación sin cambiar sustancialmente la presente invención.

25 La presente invención tal y como se define en las reivindicaciones, en una realización, contempla además el uso de una base de consulta de datos de capacitación que comprende niveles de molécula efectora inmune de un sujeto con un nivel conocido de capacidad de inmunorrespuesta mediada por células, para generar un algoritmo que, tras la introducción de una segunda base de consulta de datos que comprenden niveles de la misma molécula efectora inmune de un sujeto con un nivel de capacidad de inmunorrespuesta desconocida, proporciona un índice de probabilidad que predice la naturaleza de la capacidad de inmunorrespuesta mediada por células.

30 La expresión "datos de capacitación" incluye el conocimiento de los niveles de una molécula efectora inmune en relación con un control, en donde la molécula efectora inmune se determina después de la exposición de los linfocitos a uno o varios agentes que potencian el sistema inmune adaptativo e innato. Un "control" incluye una comparación con niveles de una molécula efectora inmune en un sujeto con una capacidad de inmunorrespuesta "normal", o puede ser un nivel determinado estadísticamente basándose en ensayos.

35 Por lo tanto, la expresión "datos de capacitación" incluye niveles de una molécula efectora inmune.

40 Los niveles o concentraciones de la molécula efectora inmune proporcionan los datos del ensayo introducidos, mencionados en este documento como una "segunda base de datos de consulta". La segunda base de datos de consulta se considera en relación con un control o se introduce en un algoritmo generado por una "primera base de datos de consulta" que comprende información de los niveles de un efector inmune en un sujeto con un estado inmunológico conocido. La segunda base de datos de datos es de un sujeto con un estado desconocido con respecto a la capacidad de inmunorrespuesta mediada por células. La generación del algoritmo o la comparación con un control es una probabilidad o un factor de riesgo, denominado en este documento "un índice de probabilidad", de que un sujeto tenga cierto nivel de capacidad de inmunorrespuesta o de inmunosupresión.

45 Los datos generados a partir de los niveles de una molécula efectora inmune son datos de entrada. La entrada de datos que comprenden los niveles de efector inmune se compara con un control o se coloca en el algoritmo que proporciona un valor de riesgo de la probabilidad de que el sujeto tenga, por ejemplo, una afección inmunosupresora. También se puede realizar un seguimiento de un régimen de tratamiento para determinar la presencia de cualquier inmunosupresión. Un nivel de inmunosupresión puede aumentar el riesgo de que un sujeto contraiga una infección secundaria o tenga una recidiva (por ejemplo, durante la terapia del cáncer o un tratamiento de una infección patógena).

50 Tal y como se ha descrito anteriormente, los métodos para diagnosticar una capacidad de inmunorrespuesta o una afección inmunosupresora mediante la determinación del grado en que un sujeto puede desarrollar una respuesta inmune adaptativa e innata a través de un nivel de una molécula efectora inmune, proporciona una segunda base de datos de consulta en un algoritmo generado con datos de la primera base de consulta o niveles de la misma molécula efectora en sujetos con un estado inmune conocido. También se proporcionan métodos para detectar la capacidad de respuesta inmune, que comprenden determinar la presencia y/o la velocidad de una molécula efectora inmune después de una estimulación del sistema inmune innato y adaptativo en una muestra de un sujeto. Por "veloci-

dad" se entiende el cambio en la concentración de la molécula efectora en una muestra de un sujeto a lo largo del tiempo.

5 Como se ha indicado anteriormente, el término "muestra" tal y como se usa en este documento, significa cualquier muestra que contenga una molécula efectora después de la estimulación de un proceso inmune innato y adaptativo incluyendo, sin limitarse a, fluidos biológicos (incluyendo sangre completa, plasma, suero, ascitis), extractos de tejidos, células recién recogidas y lisados de células que se han incubado en cultivos celulares.

10 El método de la invención tal y como se define en las reivindicaciones, se puede usar en el diagnóstico y la estadificación de una enfermedad. La presente invención también se puede usar para realizar un seguimiento de la progresión de una afección y para realizar un seguimiento de si un tratamiento particular es eficaz o no. En particular, el método puede usarse para realizar un seguimiento de una inmunosupresión después de una cirugía, una terapia contra el cáncer u otra medicación o exposición a sustancias tóxicas.

En una realización de la invención tal y como se define en las reivindicaciones, el método puede comprender un método para realizar un seguimiento de una inmunosupresión en un sujeto, que comprende:

- (a) proporcionar una muestra de un sujeto;
- 15 (b) determinar el nivel de una molécula efectora inmune después de una estimulación de procesos inmunes innatos y adaptativos;

en donde el nivel del efector inmune en relación con un control proporciona una correlación con el estado de la capacidad de inmunorrespuesta mediada por células y someter los niveles a un algoritmo para proporcionar un índice de probabilidad de que el sujeto tenga un cierto nivel de capacidad de inmunorrespuesta; y

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

25 La referencia a un "algoritmo" o "funciones algorítmicas" tal y como se ha descrito anteriormente, incluye la realización de una función de análisis univariado o multivariado. Se puede implementar una serie de diferentes estructuras y plataformas además de las descritas anteriormente. Se apreciará que se puede usar cualquier forma de estructura adecuada para implementar la presente invención. Sin embargo, una técnica beneficiosa es el uso de estructuras distribuidas. En particular, se pueden proporcionar varias estaciones finales en ubicaciones geográficas respectivas. Esto puede aumentar la eficiencia del sistema al reducir los costes y los requerimientos de ancho de banda, además de garantizar que si una estación base se congestiona o se produce un fallo, otras estaciones finales podrían asumir el control. Esto también permite compartir la carga o similares, para garantizar que el acceso al sistema esté disponible en todo momento.

En ese caso, sería necesario garantizar que la estación base contenga la misma información y firma, de modo que se puedan usar diferentes estaciones finales.

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

40 En los aspectos anteriores, el término "datos" significa los niveles o concentraciones del efector inmune después de una potenciación de procesos inmunes adaptativos e innatos. La "red de comunicaciones" incluye la red de internet y de telefonía móvil y la línea telefónica terrestre. Cuando se usa un servidor, generalmente es un servidor para clientes o más particularmente un protocolo de aplicación de objeto simple (SOAP).

45 Se incluyen experimentos que demuestran la capacidad de respuesta inmune mediada por células de un sujeto midiendo la capacidad de respuesta frente a agentes estimulantes inmunes innatos y adaptativos particulares. En una realización de la invención tal y como se define en las reivindicaciones, una o varias muestras, tales como una muestra de sangre periférica, de una fracción de glóbulos blancos enriquecida de la sangre o de un lavado broncoalveolar, se puede obtener a partir de un sujeto que tiene o se sospecha que ha desarrollado una enfermedad particular (por ejemplo, una enfermedad autoinmune, una infección con un agente patógeno o una exposición a berilio) y medir la capacidad de respuesta inmune mediante la determinación de moléculas efectoras a partir de linfocitos T efectoras (por ejemplo, linfocitos T CD4<sup>+</sup>). El ensayo se realiza en presencia de uno o varios agentes que potencian las respuestas inmunes adaptativas e innatas tal y como se define en las reivindicaciones.

50 Los métodos de inmunología incluyen métodos para detectar o cuantificar la cantidad de un componente reactivo en una muestra, en donde los métodos requieren la detección o la cuantificación de cualquier complejo inmune formado durante el proceso de unión. En ese caso, se obtendría una muestra sospechosa de contener una citocina después de la coestimulación de los procesos inmunes adaptativos e innatos, tal y como se define en las reivindicaciones y se pondría en contacto la muestra con un anticuerpo y después se detectaría o cuantificaría la cantidad de  
55 complejos inmunes formados en las condiciones específicas.

- 5 Poner en contacto la muestra biológica elegida con el anticuerpo en condiciones efectivas y durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunes (complejos inmunes primarios) generalmente es cuestión de añadir la composición a la muestra e incubar la mezcla durante un período de tiempo suficiente para que los anticuerpos formen complejos inmunes con, es decir, para unirse a, cualquier antígeno presente. Una vez transcurrido ese tiempo, la composición de muestra-anticuerpo, tal como una sección de tejido, placa de ELISA, ELISpot, transferencia de manchas o transferencia Western, generalmente se lavará para eliminar cualquier especie de anticuerpo que no se una específicamente, permitiendo que solo se detecten los anticuerpos unidos específicamente dentro de los complejos inmunes primarios.
- 10 En una realización particular de la invención tal y como se define en las reivindicaciones, el método contempla detectar la presencia, ausencia, nivel o estadio de una enfermedad o una afección en un sujeto humano, comprendiendo el método poner en contacto sangre completa, que comprende al menos el 10% del volumen total en una mezcla de reacción, con uno o varios agentes que potencian el sistema inmune adaptativo e innato y medir la presencia o el aumento del nivel de una molécula efectora inmune procedente de linfocitos T, en donde la presencia o el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo de la enfermedad o la afección.
- 15 La presente descripción se refiere a kits para uso con los métodos descritos anteriormente. En un ejemplo, se contempla un kit de inmunodetección. En otro ejemplo, se contempla un kit para el análisis de una muestra procedente de un sujeto que tiene o se sospecha que está desarrollando una enfermedad inducida por un metal o químicamente. En un ejemplo más particular, se contempla un kit para el análisis de una muestra procedente de un sujeto que tiene o se sospecha que está desarrollando una enfermedad. En un ejemplo más particular, un kit es para evaluar la capacidad de respuesta inmune mediada por células de un sujeto antes o después de que se haya desarrollado un estado de enfermedad, o antes o después de que un sujeto reciba un medicamento o esté expuesto a un agente tóxico o contaminante. Si también se emplea un antígeno, el kit también puede comprender un antígeno particular.
- 20 Los reactivos de inmunodetección del kit pueden estar en cualquiera de una variedad de formas, incluyendo los marcadores detectables que están asociados o ligados al anticuerpo o al antígeno dado, y los marcadores detectables que están asociados o fijados a un ligando de unión secundario. Los ligandos secundarios ejemplares son aquellos anticuerpos secundarios que tienen afinidad de unión hacia el primer anticuerpo o antígeno, y los anticuerpos secundarios que tienen afinidad de unión hacia un anticuerpo humano.
- 25 Otros reactivos de inmunodetección adecuados para uso en los kits incluyen el reactivo de dos componentes que comprende un anticuerpo secundario que tiene afinidad de unión hacia el primer anticuerpo o antígeno, junto con un tercer anticuerpo que tiene afinidad de unión hacia el segundo anticuerpo, en donde el tercer anticuerpo está unido a un marcador detectable.
- 30 Los kits pueden comprender además una composición dividida en partes alícuotas de forma adecuada, de antígeno o molécula efectora, ya sea marcada o sin marcar, como se puede usar para preparar una curva estándar para un ensayo de detección.
- 35 Los kits pueden contener conjugados de anticuerpo-marcador, ya sea en forma totalmente conjugada, en forma de compuestos intermedios o como restos independientes para ser conjugados por el usuario del kit. Los componentes de los kits se pueden envasar en medios acuosos o de forma liofilizada.
- 40 Los medios del recipiente de cualquiera de los kits, generalmente incluirán al menos un vial, un tubo de ensayo, un frasco, una botella, una jeringa u otro medio de recipiente, en el que se puede colocar el agente de la prueba, el anticuerpo o el antígeno, y preferiblemente en partes alícuotas de forma adecuada. Cuando se proporciona un segundo o un tercer ligando de unión o un componente adicional, el kit también contendrá generalmente un segundo, un tercer u otro recipiente adicional en el que se puede colocar ese ligando o componente. Los kits de la presente invención también incluirán normalmente un medio para contener el anticuerpo, antígeno y cualquier otro recipiente para reactivos en espacio reducido para la venta comercial. Tales recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeado por inyección o soplado en los que se encuentran los viales deseados.
- 45 La presente descripción contempla además un ensayo mejorado para detectar una respuesta inmune mediada por células o su nivel en un sujeto, comprendiendo el ensayo incubar una fuente de linfocitos procedente del sujeto y detectar la presencia o el aumento de moléculas efectoras, comprendiendo la mejora incubar adicionalmente los linfocitos con uno o varios agentes que potencian los sistemas inmunes adaptativos e innatos.
- 50 La presente descripción proporciona además un método de tratamiento de un sujeto que tiene una infección patógena, un trastorno autoinmune o un cáncer o una propensión a desarrollar una afección o trastorno de ese tipo, comprendiendo el método poner en contacto una fuente de linfocitos procedente del sujeto con uno o varios agentes que potencian los sistemas inmunes adaptativos e innatos y medir la presencia o el aumento del nivel de una molécula efectora inmune procedente de los linfocitos T, en donde la presencia o el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del nivel de la capacidad de respuesta mediada por células del sujeto, lo que es indicativo de la presencia, ausencia, el nivel o el estadio de la afección o el trastorno y, a continuación, el tratamiento de la afección o el trastorno.
- 55 La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

*Desarrollo del ensayo*

Las muestras de sangre heparinizada se recogieron en tubos Li-Hep Vacuette [marca registrada] (Greiner Bio-one, Alemania).

5 Se incubaron partes alícuotas de las muestras de sangre con diversas concentraciones de agonistas de receptores de linfocitos T: fitohemaglutinina (Cellistis Limited, Australia), anticuerpo anti-CD3 $\epsilon$  humano (clon de IgG<sub>1</sub> de ratón UCHT1; eBioscience, San Diego) y anticuerpos para el complejo de receptor de linfocitos T; y agonistas del receptor de tipo Toll: ligando de TLR-2 lipomano (InvivoGen, San Diego), ligando de TLR-2 Pam3CSK4 (InvivoGen, San Diego), ligando de TLR-3 Poli (I:C) (InvivoGen, San Diego), ligando de TLR-4 lipopolisacárido (Sigma, Australia), compuesto de imidazoquinolina - ligando de TLR-7/8, R848 (InvivoGen, San Diego) y ligando de TLR-9 oligodesoxi-  
10 nucleótidos CpG (Hycult Biotechnology, Países Bajos) o control salino en una serie de tubos de extracción de sangre de diferentes tamaños, recomendados por los fabricantes de la prueba con Quantiferon humano [marca comercial registrada] (Cellestis Limited, Australia). Los agentes estimulantes independientes del receptor de linfocitos T incluyen acetato de miristato de forbol (PMA), concanavalina A (ConA) y mitógeno de hierba carmín. Las partes alícuotas  
15 pueden ser volúmenes pequeños, como 1  $\mu$ l a 1000  $\mu$ l, o volúmenes mayores, como 1,5 ml a 200 ml.

En algunos experimentos, se añadió glucosa en diversas concentraciones a la sangre antes del inicio de la incubación. En otros experimentos, dos o más agentes estimulantes que consistían en al menos un agente estimulante de TCR y un agente estimulante de TLR, se añadieron a la sangre juntos en combinación.

20 Las muestras de sangre estimulada se incubaron durante 1 a 48 horas a 37°C, después de lo cual se extrajo el plasma que estaba encima de las células sanguíneas sedimentadas. La cantidad de IFN- $\gamma$  presente en cada muestra de plasma se cuantificó después utilizando el ELISA de Quantiferon-TB [marca registrada] (Cellestis Limited, Australia) según las instrucciones del fabricante. La muestra con IFN- $\gamma$  se cuantificó alternativamente utilizando el ELISA de Quantiferon-TB Gold más sensible [marca registrada] (Cellestis Limited, Australia) según las instrucciones del fabricante.

25 Los valores de densidad óptica del ELISA para los patrones de IFN- $\gamma$  ejecutados en cada placa de ELISA, se utilizaron para construir una curva estándar a partir de la cual la cantidad de IFN- $\gamma$  presente en cada una de las muestras de plasma de la prueba, se convirtió en valores de UI/ml.

Ejemplo 2

30 *Combinaciones de agonistas dependientes del receptor de linfocitos T (TCR) y agonistas del receptor de tipo Toll (TLR)*

Las combinaciones potenciales de los agonistas de TCR y de TLR utilizados en el ensayo del Ejemplo 1 se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Combinaciones de agonistas de TCR y de TLR utilizados en el ensayo							
Agonista de TCR	Agonista de TLR						
	Pam 3CSK4 TLR-2	Lipomanano (TLR-2)	Poli (I:C)- (TLR-3)	Lipopolisacárido (TLR-4)	Imidazo-quinolina (R848) (TLR-7/8)	Oligonucleótido CpG (TLR-9)	
PHA (fitohemaglutinina)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
anticuerpo anti-CD3ε	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Enterotoxina B estafilocócica (SEB)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Anticuerpos del complejo de receptor de linfocitos T	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Ejemplo 3

*Combinación de agonistas independientes del receptor de linfocitos T (TCR) y agonistas del receptor de tipo Toll (TLR)*

5 Las combinaciones potenciales de los agonistas independientes de TCR y los agonistas de TLR utilizados en el ensayo del Ejemplo 1 se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

<i>Combinaciones de agonistas de TCR y de TLR utilizados en el ensayo</i>						
Agonistas independientes de TCR	Agonista de TLR					
	Pam 3CSK4 TLR-2	Lipomanano (TLR-2)	Poli (I:C)- (TLR-3)	Lipopolisacárido (TLR-4)	Imidazoquinolina (R848) (TLR-7/8)	Oligonucleótido CpG (TLR-9)
ConA <sup>1</sup>	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PMA <sup>2</sup>	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Mitógeno de hierba carmín	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<sup>1</sup> concanavalina A						
<sup>2</sup> acetato de miristato de forbol						

Ejemplo 4

*Evaluación del ensayo*

10 El ensayo implica la coestimulación del receptor de linfocitos T (TCR) y el receptor de tipo Toll (TLR) para evaluar la inmunidad funcional adaptativa e innata combinadas de un individuo. Una estimulación de la sangre completa *in vitro* con un solo agente estimulante de TCR o TLR en aislamiento, produce una respuesta variable entre los donantes sanos, desde niveles extremadamente altos de IFN- $\gamma$  a niveles indetectables en ciertos individuos sanos (Figura 1).  
 15 Con el fin de establecer un intervalo de referencia para los sanos y observar una disminución en la función debido a una inmunodeficiencia, se encontró una sinergia que se produce al combinar respuestas inmunes innatas y adaptativas (Figura 2). Una estimulación doble potencia las respuestas elevando la media de la población sana normal, lo que permite determinar un nivel de corte (Figura 3). Una media elevada de la población sana normal también permite observar una disminución en la respuesta de IFN- $\gamma$  de un individuo inmunodeficiente. Por lo tanto, se puede suponer una medida de la inmunosupresión debida a un tratamiento farmacológico o enfermedad, si la respuesta disminuye por debajo del umbral (corte) de la población sana.  
 20

Ejemplo 5

*Uso del agonista del receptor de linfocitos T*

Este Ejemplo proporciona un método para evaluar la inmunidad innata y adaptativa combinada *in vitro* utilizando un agonista del receptor de tipo toll (TLR) (compuesto de imidazoquinolina, R848 que es específico de las células NK) y un agonista del receptor de linfocitos T (TCR) para la coestimulación de las células inmunes. Este diagnóstico *in vitro* es para uso con sangre completa, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y poblaciones de células purificadas con capas alimentadoras. Sin embargo, también podrían incluirse otros agonistas de TLR específicos de tipos de diferentes células del sistema inmune.  
 25

La tecnología QFN en tubo de CellaStis proporciona un método para medir la inmunidad mediada por células (CMI) después de una estimulación de la sangre completa con una combinación de agentes estimulantes que activan específicamente distintas células inmunes. La estimulación se lleva a cabo en un recipiente cerrado que se incuba durante 24 horas a 37°C sin humidificación. El plasma se recoge desde la sangre completa y el IFN- $\gamma$  se detecta mediante un ELISA de una sola etapa, que proporciona una medida de la función de las células diana. Específicamente, el ensayo mide el estado inmune funcional de individuos mediante una evaluación de la respuesta inmune  
 30

combinada innata (células NK) y adaptativa (linfocitos T). La prueba se usa para realizar un seguimiento del estado inmune general de un individuo para aplicaciones *in vitro* de diagnóstico y pronóstico.

5 El dispositivo mide la producción total de IFN, producido como respuesta a una combinación de dos agentes estimulantes proporcionados simultáneamente. El "valor" resultante se refiere al estado inmune funcional neto de un individuo en un momento dado. Esto permite una comparación longitudinal y latitudinal del estado inmune.

10 Los datos indican que el orden siguiente, TLR-7/8 > TLR-4 > TLR-3 > TLR-2 representa la eficacia decreciente de los agonistas de la clase TLR que ejercen una respuesta sinérgica cuando se usan en combinación con anticuerpo anti-CD3 (agonista de TCR) con el fin de desarrollar un ensayo diagnóstico con utilidad clínica. En este Ejemplo, por lo tanto, se emplea un agonista de TLR-7/8 tal como un compuesto de imidazoquinolina (R848) para obtener una respuesta sinérgica máxima. Sin embargo, diferentes aplicaciones pueden requerir el uso de una sinergia submáxima o incluso el uso de dos o más combinaciones de clases de TLR con un agonista de TCR, tal como un anticuerpo anti-CD3 o un mitógeno (fitohemaglutinina; PHA). Se muestra que en el ensayo diagnóstico, el mitógeno ejerce su función a través del TCR ubicado en los linfocitos T. Esto se evidencia por la capacidad del anticuerpo anti-CD3 para anular la respuesta del mitógeno cuando ambos agentes estimulantes se usan en combinación.

15 Ejemplo 6

*Determinación de la inmunosupresión en sujetos medicados*

20 El ensayo se realiza en sujetos expuestos a medicamentos tales como agentes quimioterapéuticos o agentes utilizados para tratar la artritis reumatoide, el cáncer o la enfermedad inflamatoria intestinal. En sujetos en los que se identifica una inmunosupresión, se tiene cuidado de evitar infecciones secundarias. Por ejemplo, se pueden proporcionar antibióticos o agentes inmunoestimulantes.

Ejemplo 7

*Estimulación de la sangre completa con agonista de TCR y agonista de TLR*

25 La sangre completa se estimuló con una combinación de anticuerpo anti-CD3 (agonista de TCR) y agonista de TLR-7/8; R848 (imidazoquinolina). Los niveles observados de monocina inducida por interferón gamma (MIG; CXCL9) y de IFN-γ se muestran en la Tabla 5. Los valores se muestran con el correspondiente control de ruido de fondo restado (NIL). Los datos muestran que MIG e IFN-γ se corresponden como indicadores de una estimulación.

Tabla 5

Sujeto	MIG (CXCL9) pg/mL	IFN-γ pg/mL
1	>2000	34280
2	1567	20040
3	1494	20000
4	>2000	31680
5	>2000	35320
6	>2000	73760
7	1744	25400
8	>2000	24840

30 La sangre completa también se estimuló con o sin una combinación de anticuerpo anti-CD3 (agonista de TCR) y el agonista de TLR-7/8; R848 (imidazoquinolina). El plasma resultante se utilizó para perfilar citocinas, quimiocinas y moléculas de señalización extracelular conocidas. Las dianas detectadas se podían usar individualmente o en combinación con otros efectores como moléculas informadoras. Esto es particularmente útil para la multiplexación. Las dianas detectadas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

<u>Dianas</u>
Componente del complemento 5a (C5a)
Gro $\alpha$ (CXCL1)
sICAM-1 (CD54)
IFN- $\gamma$ (IFN de tipo II)
IL-1 $\alpha$ (IL-1F1)
IL-1 $\beta$ (IL-1F2)
IL-1ra (IL-1F3)
IL-6
IL-8 (CXCL8)
IL-10
IL-16 (LCF)
IL-17
IP-10 (CXCL10)
I-TAC (CXCL11)
MCP-1 (CCL2)
MIF (GIF)
MIP-1 $\alpha$ (CCL3)
MIP-1 $\beta$ (CCL4)
Serpina E1 (PAI-1)
RANTES (CCL5)
TNF- $\alpha$ (TNFSF2)
MIG (CXCL9)

Tabla 7

	VIH+ve sin tratar (TCR)	VIH+ve sin tratar (TLR)	VIH+ve sin tratar (TCR+TLR)	Normal Sano (TCR)	Normal Sano (TLR)	Normal Sano (TCR+TLR)
Número de valores	24	24	24	50	49	50
Mínimo	0,935	0	2,65	0,67	7,78	34,17
Percentil 25%	26,63	1,601	54,35	7,068	24,74	232,1
Mediana	77,45	6,675	91,28	21,76	52,43	554
Percentil 75%	108,6	22,41	291,5	42,39	87,33	882,5
Máximo	331	122	1349	154,4	439,1	1989

5 El perfil resultante de citocinas, quimiocinas y moléculas de señalización extracelular se representa gráficamente en la Figura 4. Varias citocinas, quimiocinas y moléculas de señalización extracelular se encontraron solo en el plasma de sangre completa estimulada simultáneamente con un agonista de TCR y de TLR (barras azules, TCR + TLR). Varias otras se regularon al alza en comparación con la sangre completa sin tratar (barras rojas, NIL).

La sinergia observada entre la estimulación doble con los agonistas de TCR y de TLR en las respuestas de IFN- $\gamma$  procedentes de cultivos de sangre completa, en comparación con la estimulación de sangre completa con un agonista de TCR solo o con un agonista de TLR solo, se muestra en la Figura 5.

10 La población analizada era una cohorte infectada por el VIH y una cohorte sana normal. Las poblaciones de estudio incluyen (i) donantes VIH positivos sin tratar (provenientes de Sudáfrica); y (ii) donantes sanos normales (provenientes de Australia). Las medianas de la población se muestran en la Tabla 7.

15 En la Figura 6 se muestra una correlación entre el nivel de respuesta de IFN- $\gamma$  y el recuento de linfocitos T CD4 después de una coestimulación con TCR + TLR. Se estimuló sangre completa procedente de una cohorte infectada con VIH.

La estimulación de la sangre completa con una combinación de agonistas de TCR y TLR también permite la determinación de la concentración inhibitoria de inmunosupresor en un donante determinado (Figura 7).

**Bibliografía**

Biggs et al., *Cytometry* 36:36-45, 1999

20 Chang et al., *J. Virol.* 83:7649-58, 2009

Cooper et al., *Hematology*: 314-30, 2003

Daneshvar et al., *J. Immunol. Methods* 226(1-2):119-128, 1999

Douek et al., *Annu. Rev. Med.* 60:471-84, 2009

Durig et al., *J. Raman Spectrosc.* 24(5):281-285, 1993

25 Eriksson et al., *Biophys. J.* 2:64, 1993

Fu et al., *Nature Biotechnology* 17:1109-1111, 1999

Hengel y Kovacs, *J. Infect. Dis.* 188(12):1791-3, 2003

Hu y Gatti, *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 8(6):540-546, 2008

Kowalski et al., *J Immunotoxicol.* 4(3):225-32, 2007

- Lakowicz et al., *Biophys. J.* 72:567, 1997
- Lewis et al., *Dyes Pigm.* 42(2):197, 1999
- Malemed et al., "*Flow cytometry and sorting*", 2<sup>a</sup> ed., New York, Wiley-Liss, 1990
- Matesanz et al., *Transplant Proc.* 41(6):2297-301, 2009
- 5 Nowroozalizadeh et al., *Cytokine* 46:325-31, 2009
- Rahman et al., *J. Org. Chem.* 63:6196, 1998
- Rapaport et al., *Appl. Phys. Lett.* 74(3):329-331, 1999
- Schrem et al., *Dtsch Arztebl Int.* 106(9):148-156, 2009
- Solomon et al., *J. Infect. Dis.* 187:1915-23, 2003
- 10 Tawa et al., *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 488 [Electrical, Optical and Magnetic Properties of Organic Solid-State Materials IV], 885-890
- Youvan et al., *Biotechnology et elia* 3:1-18, 1997.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para medir una actividad de respuesta inmune mediada por células en un sujeto, comprendiendo dicho método poner en contacto una fuente de una muestra de linfocitos procedente del sujeto con uno o varios agentes que potencian el sistema inmune adaptativo y uno o varios agentes que potencian el sistema inmune innato, en donde el uno o varios agentes que potencian el sistema inmune adaptativo se seleccionan a partir del grupo que consiste en anticuerpos anti-CD3, anticuerpos contra el complejo del receptor de linfocitos T, oligonucleótidos CpG, enterotoxina B estafilocócica (SEB), fitohemaglutinina (PHA), acetato de miristato de forbol (PMA), concanavalina A (ConA) y mitógeno de hierba carmín, y en donde el uno o varios agentes que potencian el sistema inmune innato se seleccionan a partir del grupo que consiste en un ligando de TLR-3, un ligando de TLR-9 y lipomannano, y medir la presencia o el aumento del nivel de una molécula efectora inmune procedente de células inmunes, en donde la presencia o el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del nivel de la capacidad de respuesta mediada por células del sujeto.
2. Un método para medir la actividad de respuesta inmune mediada por células en un sujeto, comprendiendo dicho método poner en contacto una fuente de una muestra de linfocitos procedente del sujeto con uno o varios agentes que potencian el sistema inmune adaptativo y uno o varios agentes que potencian el sistema inmune innato y medir la presencia o el aumento del nivel de una molécula efectora inmune procedente de las células inmunes, en donde la presencia o el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del nivel de la capacidad de respuesta mediada por células del sujeto, en donde el uno o varios agentes que potencian el sistema inmune adaptativo estimulan a través de medios independientes del receptor de linfocitos T y se seleccionan a partir del grupo que consiste en acetato de miristato de forbol (PMA), concanavalina A (ConA) y mitógeno de hierba carmín.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el sujeto padece una enfermedad o una afección.
4. El método según la reivindicación 3, en el que el nivel de la molécula efectora inmune es indicativo del grado de inmunosupresión inducida o asociada con el estado de enfermedad.
5. El método según la reivindicación 1 o 2 o 3 o 4, en el que la muestra es sangre completa sin diluir y en donde la muestra es sangre completa que comprende desde aproximadamente 10% a 100% en volumen de la muestra que se va a analizar, preferiblemente la sangre completa comprende desde aproximadamente 50% a 100% en volumen de la muestra que se va a analizar y más preferiblemente la sangre completa comprende desde aproximadamente 80% a 100% en volumen de la muestra que se va a analizar.
6. El método según la reivindicación 1 o 2 o 3 o 4, en el que la sangre completa se incuba adicionalmente con un antígeno.
7. El método según la reivindicación 1 o 3 o 4, en el que el agente que potencia el sistema inmune adaptativo estimula a través de medios independientes del receptor de linfocitos T.
8. El método según la reivindicación 1 o 2 o 3 o 4, en el que la molécula efectora inmune es una citocina.
9. El método según la reivindicación 1 o 2 o 3 o 4, en el que los efectores inmunes se detectan con anticuerpos específicos de los mismos.
10. El método según la reivindicación 1 o 2 o 3 o 4, en el que el sujeto tiene una infección por un agente patógeno seleccionado a partir de especies de *Mycobacterium*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Streptococcus*, especies de *Borrelia*, *Escherichia coli*, especies de *Salmonella*, especies de *Clostridium*, especies de *Shigella*, especies de *Proteus*, especies de *Bacillus*, virus del herpes, virus de la hepatitis B o C y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o una enfermedad resultante de las mismas.
11. El método según la reivindicación 10, en el que el sujeto tiene un estado de enfermedad seleccionado a partir de alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, esclerosis múltiple con enfermedad de Addison autoinmune, enfermedad autoinmune de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, dermatitis celíaca, síndrome de fatiga crónica (CFIDS), desmielinización inflamatoria crónica, polineuropatía inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de crest, enfermedad de aglutinina fría, enfermedad de Crohn, dermatitis herpetiforme, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, diabetes dependiente de insulina (de tipo I), líquen plano, lupus, enfermedad de Meniere, enfermedad de tejido conjuntivo mixto, 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, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitíligo y enfermedad inflamatoria intestinal.
12. El método según la reivindicación 1 o 2 o 3 o 4, en el que el sujeto tiene un cáncer seleccionado a partir de pro-

tooncogén ABL1, cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mie-  
 loide aguda, carcinoma adenocístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloides agnogénica, alopecia, sarcoma  
 alveolar de partes blandas, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carci-  
 5 noma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres de huesos, cáncer de intestino, glioma del tronco encefá-  
 lico, tumores cerebrales y del SNC, cáncer de mama, tumores del SNC, tumores carcinoides, cáncer cervical, tumo-  
 res cerebrales infantiles, cáncer infantil, leucemia infantil, sarcoma de tejidos blandos infantil, condrosarcoma, corio-  
 10 carcinooma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloides crónica, cánceres colorrectales, linfoma cutáneo de linfoci-  
 tos T, dermatofibrosarcoma-protuberans, tumor desmoplásico de células pequeñas redondas, carcinoma ductal,  
 cánceres endocrinos, cáncer endometrial,ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de conducto  
 15 biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma ocular, retinoblastoma, cáncer de trompa de Falopio, anemia de fan-  
 coní, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor gastrointestinal  
 carcinoide, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma,  
 cánceres ginecológicos, neoplasias hematológicas, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer  
 20 hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, virus del papiloma humano, mola  
 hidatiforme, hipercalcemia, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, cánceres de células de los islotes, sarcoma  
 de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leiomiomasarcoma, leucemia,  
 síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labios, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma,  
 linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide maligno de riñón, meduloblas-  
 25 toma, melanoma, cáncer de células de merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endo-  
 crina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, mieloma, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasal,  
 cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de rotura de nijmegen, cáncer de  
 piel no melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cánceres oculares, cáncer de esófago, cán-  
 30 cer de la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario por ostomía, cáncer de páncreas, cáncer  
 paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer de glándula parótida, cáncer de pene, cáncer de pene, tumores neuroec-  
 todérmicos periféricos, cáncer de la pituitaria, policitemia vera, cáncer de próstata, cánceres raros y trastornos aso-  
 ciados, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomiosarcoma, síndrome de Rothmund-Thomson, cáncer  
 de las glándulas salivares, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células  
 35 pequeñas (SCLC), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, tumores de la médula espinal, carcinoma  
 de células escamosas (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer de testículo, cáncer de timo, cáncer de  
 tiroides, cáncer de células de transición (vejiga), cáncer de células de transición (renal-pelvis/uréter), cáncer trofo-  
 blástico, cáncer de uretra, cáncer del sistema urinario, uroplaquinas, sarcoma uterino, cáncer de útero, cáncer de  
 40 vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms.

13. Uso de uno o varios agentes que potencian el sistema inmune adaptativo y uno o varios agentes que potencian  
 el sistema inmune innato en la preparación de un ensayo diagnóstico de la capacidad de respuesta inmune mediada  
 35 por células mediante el método de incubar agentes estimulantes innatos y adaptativos con una fuente que compren-  
 de linfocitos T y células NK y detectar la presencia o el aumento de moléculas efectoras, en donde el uno o varios  
 agentes que potencian el sistema inmune adaptativo se seleccionan a partir del grupo que consiste en anticuerpos  
 anti-CD3, anticuerpos contra el complejo del receptor de linfocitos T, oligonucleótidos CpG, enterotoxina B estafilo-  
 40 cócica (SEB), fitohemaglutinina (PHA), acetato de miristato de forbol (PMA), concanavalina A (ConA) y mitógeno de  
 hierba carmín, en donde el ensayo diagnóstico es para el diagnóstico de

una infección por un agente patógeno seleccionado a partir de especies de *Mycobacterium*, especies de *Staphylo-  
 coccus*, especies de *Streptococcus*, especies de *Borrelia*, *Escherichia coli*, especies de *Salmonella*, especies de  
*Clostridium*, especies de *Shigella*, especies de *Proteus*, especies de *Bacillus*, virus del herpes, virus de la hepatitis B  
 o C y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o una enfermedad resultante de las mismas;

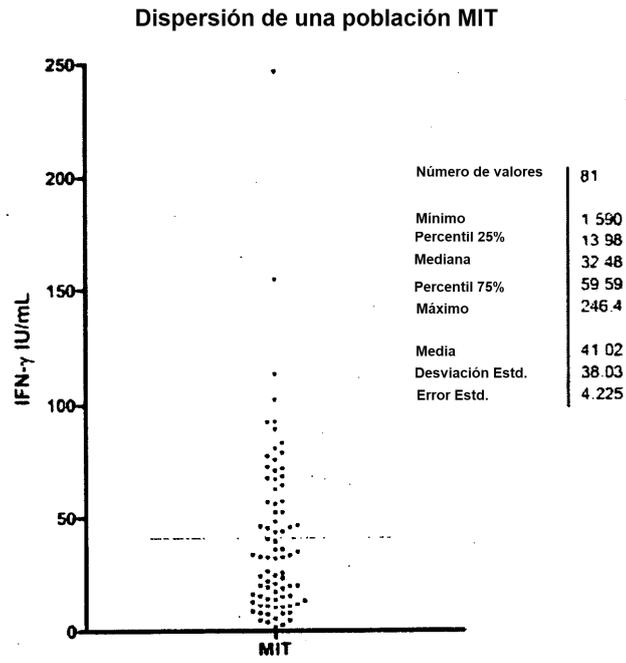
45 un estado de enfermedad seleccionado a partir de alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípi-  
 do, esclerosis múltiple con enfermedad de Addison autoinmune, enfermedad autoinmune de la glándula suprarrenal,  
 anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, enfermedad de Behcet, penfi-  
 goide ampolloso, cardiomiopatía, dermatitis celiaca, síndrome de fatiga crónica (CFIDS), desmielinización inflamato-  
 50 ria crónica, polineuropatía inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de crest,  
 enfermedad de aglutinina fría, enfermedad de Crohn, dermatitis herpetiforme, lupus discoide, crioglobulinemia mixta  
 esencial, fibromialgia, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmo-  
 nar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, diabetes dependiente de insulina (de  
 55 tipo I), liquen plano, lupus, enfermedad de Meniere, enfermedad de tejido conjuntivo mixto, esclerosis múltiple, mias-  
 tenia grave, miocarditis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandula-  
 res, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, pso-  
 riasis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia,  
 60 síndrome de Sjogren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis tem-  
 poral/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitíligo y enfermedad inflamatoria intestinal; o

un cáncer seleccionado a partir de protooncogén ABL1, cánceres relacionados con el SIDA, neuroma acústico, leu-  
 60 cemia linfocítica aguda, leucemia mieloides aguda, carcinoma adenocístico, cáncer adrenocortical, metaplasia mieloi-  
 de agnogénica, alopecia, sarcoma alveolar de partes blandas, cáncer anal, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocito-  
 ma, ataxia-telangiectasia, carcinoma de células basales (piel), cáncer de vejiga, cánceres de huesos, cáncer de  
 intestino, glioma del tronco encefálico, tumores cerebrales y del SNC, cáncer de mama, tumores del SNC, tumores

5 carcinoides, cáncer cervical, tumores cerebrales infantiles, cáncer infantil, leucemia infantil, sarcoma de tejidos blandos infantil, condrosarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cánceres colorectales, linfoma cutáneo de linfocitos T, dermatofibrosarcoma-protuberans, tumor desmoplásico de células pequeñas redondas, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, cáncer de conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, melanoma ocular, retinoblastoma, cáncer de trompa de Falopio, anemia de fanconi, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor gastrointestinal carcinoide, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, cánceres ginecológicos, neoplasias hematológicas, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, virus del papiloma humano, mola hidatiforme, hipercalcemia, cáncer de hipofaringe, melanoma intraocular, cáncer de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leiomiomasarcoma, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labios, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor rabdoide maligno de riñón, meduloblastoma, melanoma, cáncer de células de merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, mieloma, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, nefroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de rotura de nijmegen, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cánceres oculares, cáncer de esófago, cáncer de la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario por ostomía, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer de paratiroides, cáncer de glándula parótida, cáncer de pene, 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, rabdomiosarcoma, síndrome de Rothmund-Thomson, cáncer de las glándulas salivares, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, tumores de la médula espinal, carcinoma de células escamosas (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial,
 10 15 20 25

14. El método según la reivindicación 1, en el que el ligando de TLR-9 es oligodesoxinucleótido CpG.

30 15. El método según la reivindicación 1, en el que el ligando de TLR-3 es poli (I:C).



**Figura 1A**

Dispersión de una población CD3 (UCHT1)

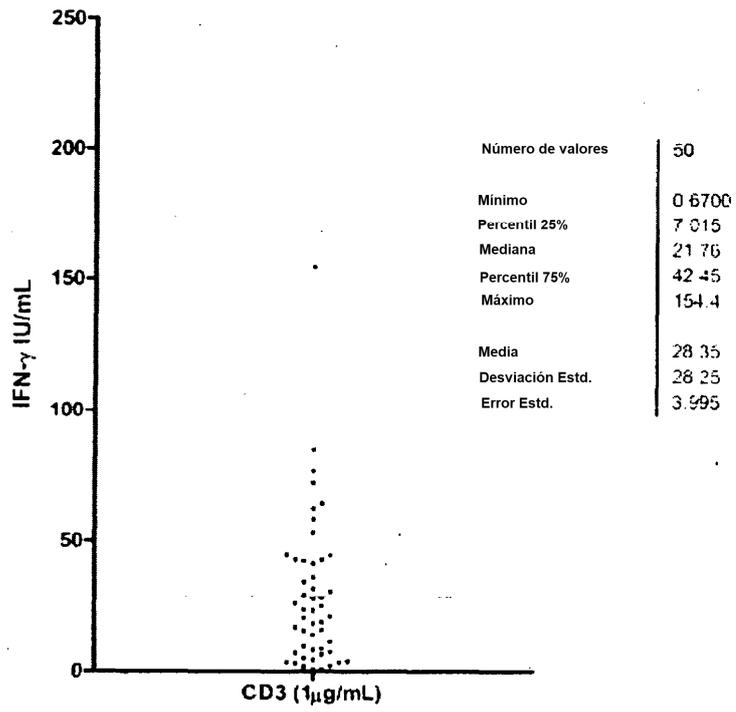


Figura 1B

Dispersión de una población de R848

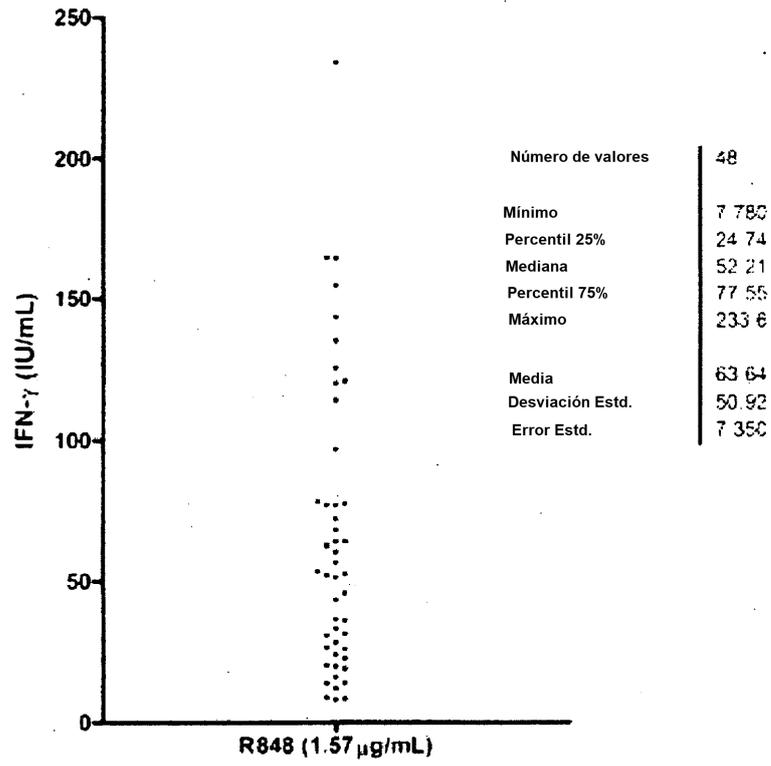


Figura 1C

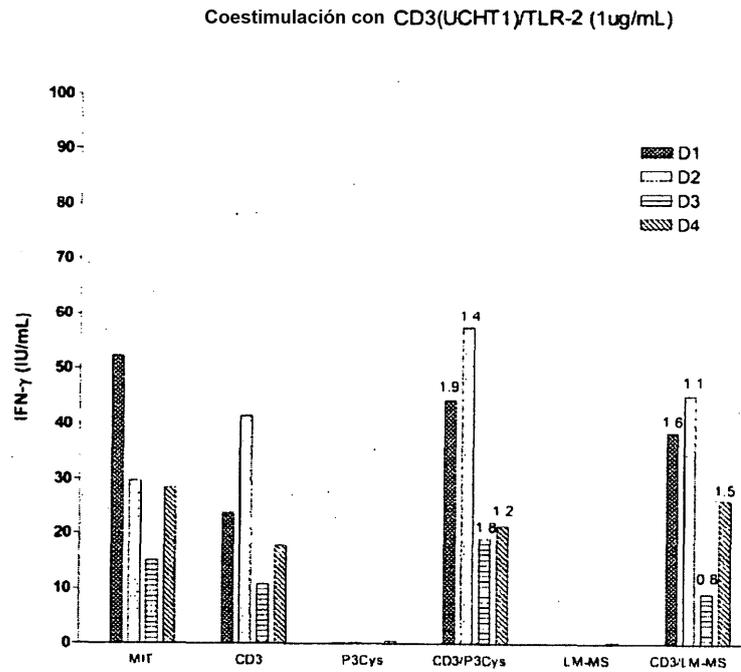


Figura 2A

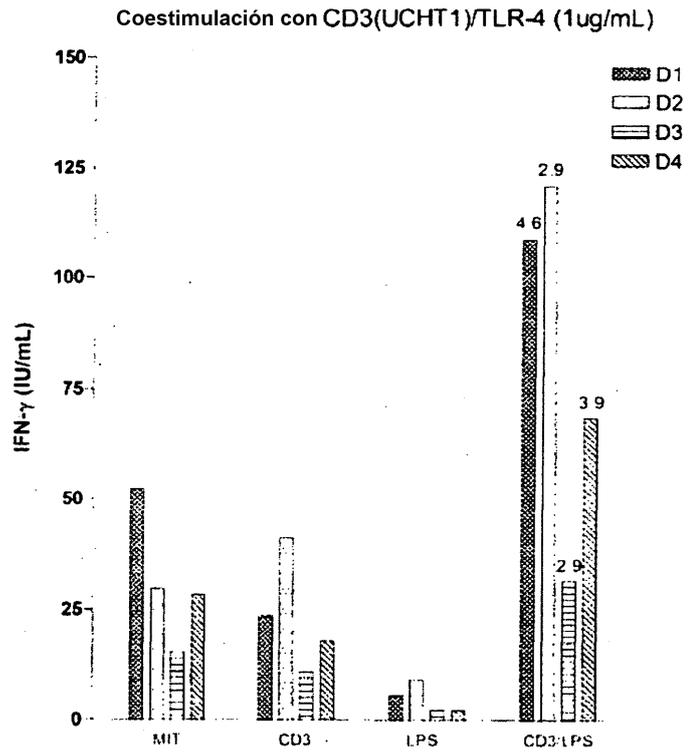


Figura 2B

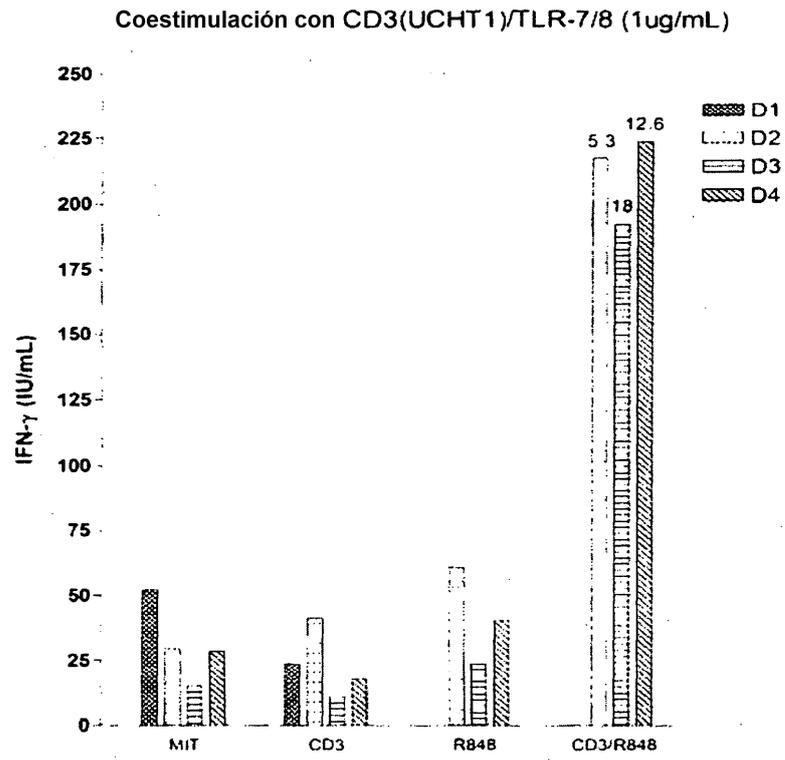
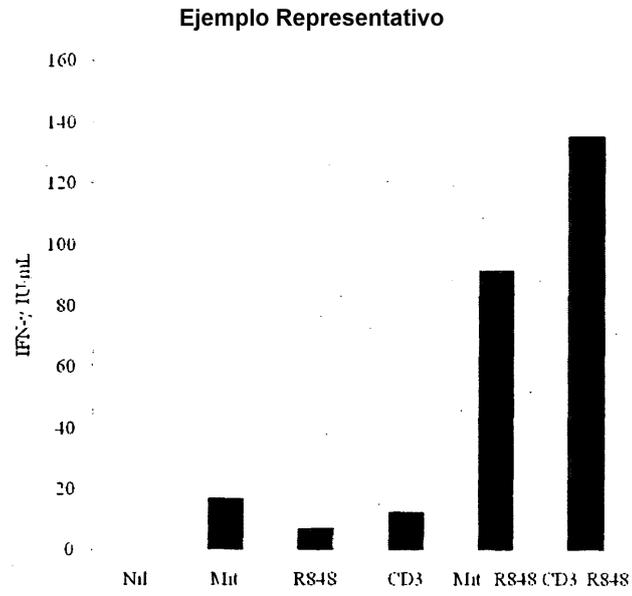
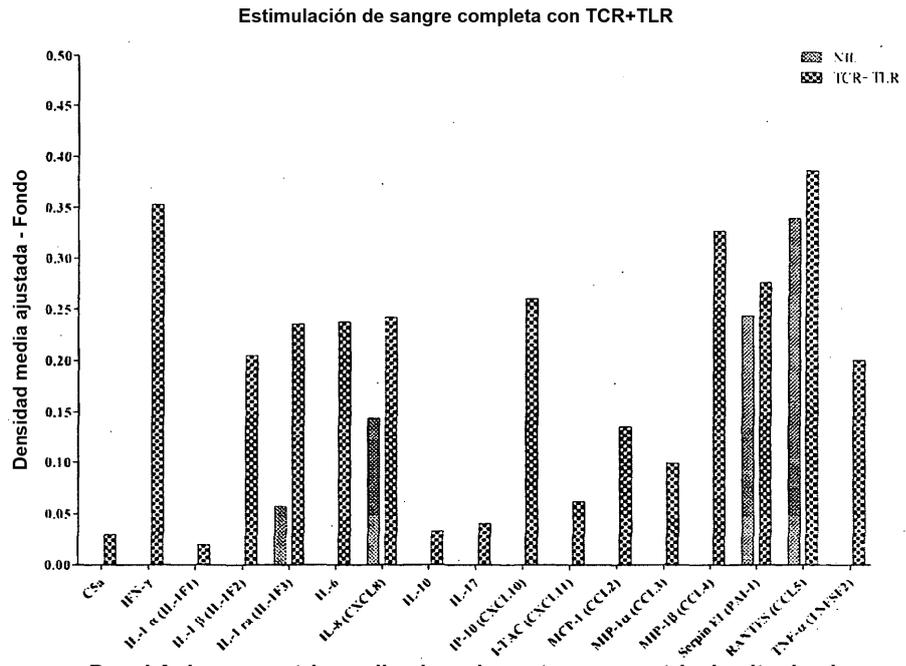


Figura 2C



**Figura 3**



Panel A de una matriz analizadora de proteoma - matriz de citocina humana

Figura 4

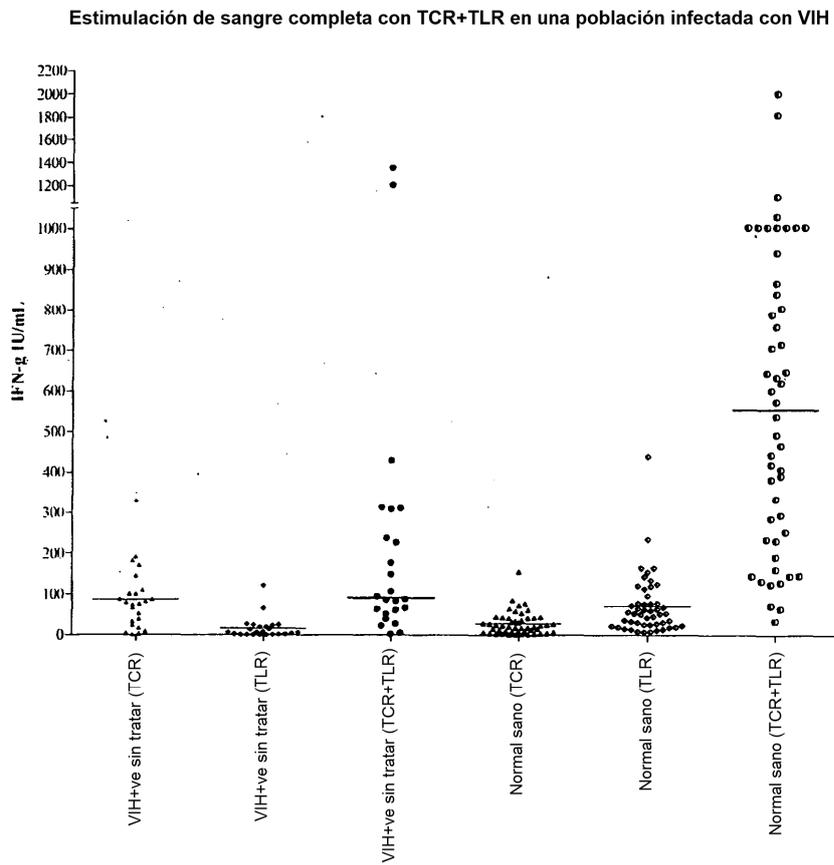


Figura 5

Correlación de INF-g estimulado con TCR+TLR con recuento de CD4 en una población infectada con VIH

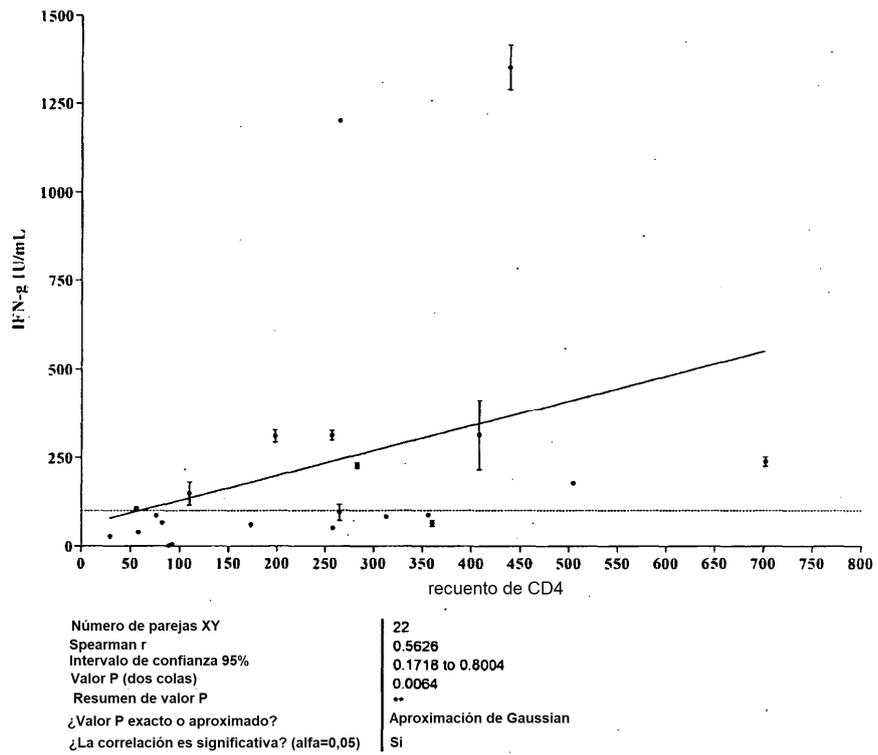


Figura 6

Sangre completa tratada con inmunosupresor (FK-506+Rapamicina)  
 estimulada con agonistas de TCR+TLR

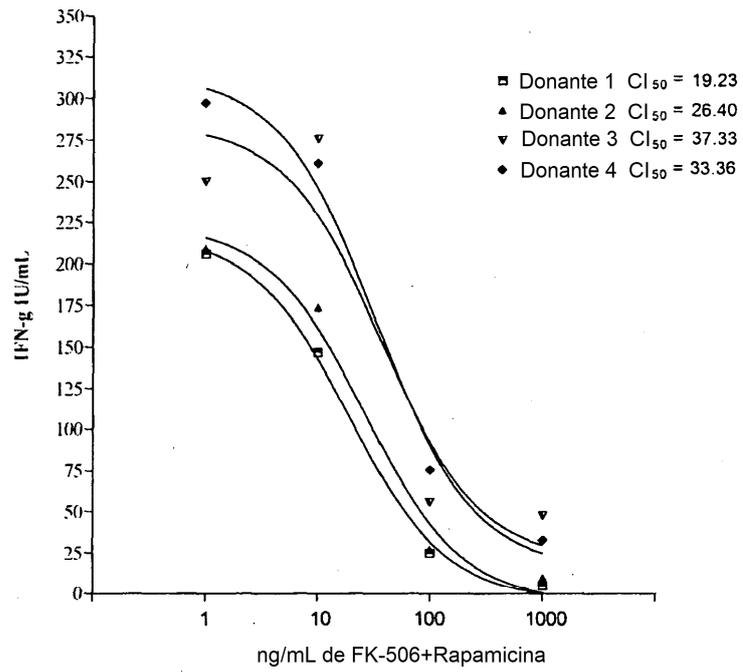


Figura 7