



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 950 436**

⑮ Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2017 PCT/US2017/063525**

⑰ Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2018 WO18111536**

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2017 E 17881823 (3)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2023 EP 3555630**

⑮ Título: **Métodos y composiciones para obtener una valoración de tuberculosis en un sujeto**

⑯ Prioridad:

14.12.2016 US 201662434328 P

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.10.2023

⑮ Titular/es:

TECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive, MC 110
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US

⑯ Inventor/es:

GHANEKAR, SMITA;
SUNI, MARJA y
INOKUMA, MARGARET

⑯ Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 950 436 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

Métodos y composiciones para obtener una valoración de tuberculosis en un sujeto

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

De conformidad con 35 U.S.C. § 119(e), esta solicitud reivindica prioridad de la fecha de presentación de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Núm. de Serie 62/434.328, presentada el 14 de diciembre de 2016.

Introducción

La enfermedad de TB está causada por una bacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Las bacterias comúnmente infectan los pulmones, pero las bacterias de la TB también pueden infectar cualquier otra parte del organismo, incluidos, por ejemplo, los riñones, la columna vertebral y el cerebro. Si no se trata adecuadamente, la enfermedad de TB puede ser fatal. La TB generalmente se transmite a través del aire de una persona infectada a una segunda persona, p. ej., cuando una persona con infección de TB o enfermedad de TB de los pulmones o la garganta, tose, estornuda, habla o canta y una segunda persona inhala las bacterias del aire.

Aproximadamente un tercio de la población mundial tiene TB latente, lo que significa que las personas han sido infectadas por la bacteria de la TB, pero son asintomáticas y no pueden transmitir la enfermedad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la TB ocupa el segundo lugar después del VIH/SIDA como la mayor causa de muerte en todo el mundo debido a un solo agente infeccioso. Por ejemplo, en 2012, 8,6 millones de personas enfermaron de TB y 1,3 millones murieron a causa de la TB. Además, la TB tiene una alta prevalencia en el mundo en desarrollo, produciéndose más de 95% de las muertes por TB en países de bajos y medianos ingresos. La TB se encuentra entre las tres principales causas de muerte entre las mujeres de 15 a 44 años. La TB también es muy frecuente en los niños. Por ejemplo, en 2012, aproximadamente 530.000 niños enfermaron de TB y 74.000 niños seronegativos para VIH murieron a causa de la TB. La infección conjunta de TB y VIH sigue siendo una carga importante para la salud, ya que la TB es una de las principales causas de muerte de las personas que viven con VIH y causa una quinta parte de todas las muertes. La TB resistente a múltiples fármacos está presente en prácticamente todos los países encuestados por la OMS.

Un individuo infectado puede ser asintomático. Alguien con una infección de tuberculosis activa generalmente muestra síntomas de tos crónica y esputo teñido de sangre, lo que se conoce como infección de tuberculosis pulmonar activa (ATB). Las infecciones tuberculosas asintomáticas o latentes (LTBI) a menudo no progresan a ATB para un individuo con un sistema inmunológico saludable. Sin embargo, las personas con un sistema inmunológico comprometido, tales como los ancianos y las personas con VIH, tienen una probabilidad mucho mayor de desarrollar ATB potencialmente mortal.

La referencia Wang et al. (2010) Journal of Infection 60: 133-139 se refiere a células T de memoria que son el sello distintivo de las respuestas inmunológicas adquiridas.

La referencia Jiang et al. (2010) Journal of Clinical Immunology 30: 566-573 se refiere a CD27, un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, que tiene un papel importante en la generación de inmunidad de células T.

La referencia Hutchinson et al. (2014) Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 22: 200-212 se refiere a una prueba cutánea de tuberculina y ensayos de liberación de interferón gamma que se utilizan como pruebas complementarias para la evaluación de casos sospechosos de tuberculosis activa.

La referencia US 20111070599 A1 divulga un ensayo mejorado y simplificado para su uso en el diagnóstico de infecciones activas de tuberculosis. El ensayo se lleva a cabo utilizando una muestra de sangre completa, no requiere separar la sangre en componentes, tal como el aislamiento de mononucleocitos de sangre periférica (PBMC), y se lleva a cabo utilizando solo la tinción de la superficie celular de las células T.

Compendio

La invención se define en las reivindicaciones.

Se proporcionan métodos para obtener una evaluación de tuberculosis en un sujeto. Los aspectos de los métodos incluyen analizar una muestra activada con tuberculosis (TB) del sujeto para al menos uno de: (i) células T CD154⁺; y (ii) células T que tienen un fenotipo de memoria central, tal como un fenotipo de memoria central 1 (CM1), correspondiente a infección por tuberculosis latente (LTBI), un fenotipo de memoria central 2 (CM2) correspondiente a la aparición de tuberculosis activa (ATB) subclínica o un fenotipo de memoria central 3 (CM3) correspondiente a ATB subclínica más avanzada; para obtener una firma de biomarcador de TB, y a continuación obtener una evaluación de tuberculosis para el sujeto a partir de la firma de biomarcador de TB en donde la evaluación de tuberculosis es una de las siguientes: CM 1, CM2 o CM3. Los aspectos de la invención incluyen adicionalmente los reactivos, dispositivos, sistemas y kits de los mismos que encuentran uso en la práctica de los métodos en cuestión que se proporcionan. Los métodos y composiciones encuentran uso en una variedad de aplicaciones, incluyendo el diagnóstico de TB y el

seguimiento del tratamiento de TB.

Breve descripción de las figuras

La invención se comprende mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee junto con los dibujos adjuntos. Se enfatiza que, de acuerdo con la práctica común, las diversas características de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de las diversas características se amplían o reducen arbitrariamente para mayor claridad. En los dibujos se incluyen las siguientes figuras.

La FIG. 1 ilustra gráficamente los marcadores de diferenciación de células T específicos de TB para pronosticar la progresión de TB Latente a infección por TB Clínica (activa).

Descripción detallada

10 Se proporcionan métodos para obtener una evaluación de tuberculosis en un sujeto. Los aspectos de los métodos incluyen analizar una muestra activada con tuberculosis (TB) del sujeto para determinar al menos uno de: (i) células T CD154⁺; y (ii) células T que tienen un fenotipo de memoria central, tal como un fenotipo de memoria central 1 (CM1) correspondiente a infección tuberculosa latente (LTBI), un fenotipo de memoria central 2 (CM2) correspondiente a la aparición de tuberculosis activa (ATB) subclínica o un fenotipo de memoria central 3 (CM3) correspondiente a ATB subclínica más avanzada; para obtener una firma de biomarcador de TB, y a continuación obtener una evaluación de tuberculosis para el sujeto a partir de la firma de biomarcador de TB en donde la evaluación de tuberculosis es una de las siguientes: CM1, CM2 o CM3. Los aspectos de la invención incluyen adicionalmente los reactivos, dispositivos, sistemas y kits de los mismos que encuentran uso en la práctica de los métodos en cuestión que se proporcionan. Los métodos y composiciones encuentran uso en una variedad de aplicaciones, incluyendo el diagnóstico de TB y el seguimiento del tratamiento de TB.

20 Antes de describir los presentes métodos y composiciones, se debe entender que esta invención no se limita al método o a la composición en particular descritos, ya que estos pueden, por supuesto, variar. También se debe entender que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

25 Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que también se divulga específicamente cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese rango. Cada rango más pequeño entre cualquier valor establecido o valor intermedio en un rango establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese rango establecido está incluido en la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños se pueden incluir o excluir independientemente en el rango, y cada rango en el que cualquiera, ninguno o ambos límites están incluidos en los rangos más pequeños también está incluido dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango indicado. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen uno o ambos límites incluidos también se incluyen en la invención.

30 35 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. A continuación, se describen algunos métodos y materiales potenciales y preferidos.

40 45 Como resultará evidente para los expertos en la técnica al leer esta divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en el presente documento tiene componentes y características discretos que pueden separarse o combinarse fácilmente con las características de cualquiera de las otras realizaciones sin apartarse del alcance de la presente invención. Cualquier método citado se puede llevar a cabo en el orden de los eventos citados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

50 55 Debe señalarse que tal como se emplean en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una" y "el" y "la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y la referencia al "péptido" incluye la referencia a uno o más péptidos y equivalentes de los mismos, p. ej. polipéptidos, conocidos por los expertos en la técnica, etc.

Las publicaciones discutidas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo aquí contenido debe ser interpretado como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a ser anterior a tal publicación en virtud de una invención anterior. Adicionalmente, las fechas de publicación proporcionadas pueden diferir de las fechas de publicación reales, por lo que es posible que sea necesario confirmarlas de forma independiente.

Métodos

La presente divulgación proporciona métodos para realizar una evaluación de TB en un sujeto. Por realizar una "evaluación de TB" o una "evaluación de TB en un sujeto", se entiende una evaluación de un sujeto con respecto a la

- 5 TB, cuya evaluación puede estar en una variedad de formatos, que incluyen, pero no se limitan a: diagnosticar la presencia de TB en el sujeto, realizar un seguimiento clínico de TB en un sujeto, etc. El diagnóstico de TB incluye, p. ej., el diagnóstico de la enfermedad de TB y, en algunos casos, la discriminación, p. ej., entre infección de TB latente (LTBI), enfermedad de TB progresiva, TB activa (ATB) TB resistente a los fármacos, etc. Una evaluación que incluye un diagnóstico de TB también puede incluir la determinación de un tratamiento o el curso del tratamiento para un paciente que se sospecha que tiene infección por TB o enfermedad de TB. El control clínico de la TB incluye, p. ej., la evaluación de la progresión clínica de la TB en un sujeto, incluyendo, p. ej., la evaluación de la progresión de la TB en el sujeto, tal como la transición de LTBI a ATB, la evaluación de la eficacia del tratamiento y la respuesta del paciente al tratamiento, la evaluación de los criterios de valoración del tratamiento, el seguimiento post-tratamiento, etc.
- 10 Las evaluaciones de la TB se pueden obtener mediante la producción y el análisis de una firma de biomarcador de TB. En algunos casos, la evaluación de la TB, p. ej., un diagnóstico de TB, se obtiene a través de la detección de una firma de biomarcador de TB particular obtenida para un sujeto, p. ej., un sujeto que se sospecha que tiene TB. En otros casos, la evaluación de la TB, p. ej. la evaluación clínica, incluyendo, pero sin limitarse a, p. ej., la evaluación clínica del estado de enfermedad de la TB, la evaluación clínica de la progresión de la enfermedad de TB, la evaluación clínica de la progresión del tratamiento de la TB o la evaluación clínica del resultado del tratamiento de la TB, se obtienen a través de la detección de una firma de biomarcador particular de TB obtenida para un sujeto que se sabe que tiene TB.

Firmas de biomarcadores de TB

- 20 Las evaluaciones de TB, como se describen en el presente documento, se realizan, ya sea solas o combinadas con otras evaluaciones o factores (p. ej., como se describe a continuación), en función de una firma de biomarcador de TB. Por "firma de biomarcador" se entiende la presencia, ausencia o nivel relativo, p. ej., el nivel de expresión, de uno o más biomarcadores individuales como se describe en el presente documento. La cantidad de biomarcadores que componen una firma de biomarcadores variará y, en algunos casos, puede oscilar entre 1 y 200, incluyendo, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, de 1 a 3, del 2 al 5, de 1 a 5, de 5 a 10, de 2 a 8, de 1 a 10, de 5 a 15, de 10 a 20, de 20 a 40, de 30 a 50, de 40 a 60, de 50 a 70, de 60 a 80, de 70 a 90, de 80 a 100, de 50 a 150, de 100 a 200, de 150 a 200, etc. En ciertos casos, una firma de biomarcador incluye una evaluación cualitativa del biomarcador, incluyendo, p. ej., una evaluación cualitativa del nivel o expresión o cambio en el nivel o expresión del biomarcador. En algunos casos, la firma de un biomarcador incluye una o más mediciones cuantitativas de un biomarcador incluyendo, p. ej., mediciones del nivel de un biomarcador o el nivel de expresión de un biomarcador, incluyendo, p. ej., mediciones del nivel de expresión absoluta del biomarcador, mediciones del nivel de expresión relativa del biomarcador (p. ej., relativo a un segundo biomarcador o un biomarcador de referencia o nivel de biomarcador de referencia, etc.), mediciones del cambio en la expresión de un biomarcador (p. ej., el cambio en la expresión de un biomarcador en respuesta a un estímulo o el cambio en la expresión de un biomarcador a lo largo del tiempo, etc.) y similares.
- 35 En algunos casos, la firma de un biomarcador puede incluir mediciones categóricas de uno o más biomarcadores. Las mediciones categóricas de biomarcadores de una firma de biomarcador pueden ser cualitativas o cuantitativas. En algunos casos, las mediciones categóricas cualitativas de biomarcadores incluidas en una firma de biomarcadores se basan en evaluaciones cualitativas de biomarcadores que se agrupan en categorías basadas en criterios de agrupamiento (p. ej., presente o ausente; positivo o negativo; alto o bajo; alto, medio o bajo, normal o anormal, suficiente o deficiente, detectable o no detectable, significativo o no significativo, no significativo, significativo o muy significativo, etc.). En algunos casos, las mediciones categóricas cuantitativas de biomarcadores incluidas en una firma de biomarcador se basan en mediciones cuantitativas de biomarcadores que se agrupan en categorías basadas en criterios de agrupamiento (p. ej., presente o ausente; positivo o negativo; alto o bajo; alto, medio o bajo, normal o anormal, suficiente o deficiente, detectable o no detectable, significativo o no significativo, no significativo, significativo o muy significativo, etc.). Los criterios de agrupamiento para categorizar biomarcadores de una firma de biomarcador pueden variar y se pueden determinar por cualquier medio conveniente, incluyendo, p. ej., evaluación visual de datos de biomarcadores, evaluación estadística de datos de biomarcadores, pruebas empíricas de biomarcadores, pruebas basadas en hipótesis de biomarcadores o datos de biomarcadores, modelado por ordenador de datos de biomarcadores, etc. En algunos casos, descritos con más detalle en otra parte del presente documento, el agrupamiento también se denomina umbralización y se utiliza para categorizar un biomarcador como presente o ausente, alto o bajo, o por encima o por debajo de un umbral.
- 55 En algunas realizaciones, una firma de biomarcador incluye una única evaluación o medición de un biomarcador para una muestra particular, p. ej., incluyendo una medición de la cantidad del biomarcador presente en la muestra. Por ejemplo, una firma de biomarcador puede incluir una medida de la cantidad de un biomarcador de proteína particular presente en una muestra de fluido, p. ej., una muestra de sangre de un sujeto. En algunas realizaciones, una firma de biomarcador incluye una pluralidad de evaluaciones o mediciones de un biomarcador para una muestra particular, p. ej., incluyendo una pluralidad de mediciones del nivel de un biomarcador dentro de un aspecto particular de la muestra. Por ejemplo, una firma de biomarcador puede incluir una pluralidad de mediciones del nivel de un biomarcador presente en o sobre la superficie de una pluralidad de células de una muestra celular, p. ej., una muestra de sangre.
- 60 En algunos casos, la firma de un biomarcador puede incluir una medición secundaria basada en una pluralidad de mediciones primarias. Las mediciones primarias pueden variar e incluir cualquiera y todas las mediciones de

biomarcadores individuales descritas en el presente documento. En algunos casos, las mediciones primarias pueden incluir evaluaciones individuales o mediciones de biomarcadores que incluyen, p. ej., mediciones de biomarcadores dentro de algún aspecto de una muestra, incluyendo, p. ej., mediciones del nivel de biomarcadores de células de una muestra celular. Las mediciones secundarias pueden variar y dependerán de la medición primaria o de la pluralidad de mediciones primarias y, en algunos casos, incluyen, pero no se limitan a, mediciones de subgrupos, subcategorías, subpoblaciones y similares. En algunos casos, cuando una pluralidad de mediciones primarias representa los niveles de un biomarcador presente en o sobre algún aspecto de una muestra, una medición secundaria puede incluir una cuantificación o categorización de la pluralidad de mediciones primarias. Por ejemplo, cuando una pluralidad de mediciones primarias representa mediciones individuales de los niveles de un biomarcador particular para células individuales, una medición secundaria puede representar una cuantificación adicional de los niveles de biomarcadores de células individuales o, p. ej., una categorización de las células en función de su nivel de biomarcador individual. Las firmas de biomarcadores de TB, aunque no se limitan a mediciones primarias y secundarias o combinaciones de las mismas, pueden incluir esencialmente solo mediciones primarias, esencialmente solo mediciones secundarias o cualquier combinación de mediciones primarias y secundarias.

15 En ciertas realizaciones, una firma de biomarcador de TB que incluye mediciones de más de un biomarcador permite una evaluación o determinación de mayor confianza que la evaluación o determinación que se podría realizar mediante el análisis de los biomarcadores de forma independiente. En algunos casos, una firma de biomarcador de TB que incluye mediciones de más de un biomarcador permite una evaluación o determinación que no podría realizarse mediante el análisis de cualquiera de los biomarcadores individuales o cualquier subcombinación de biomarcadores de la firma de biomarcador. Tales firmas de biomarcadores de TB pueden, en algunos casos, referirse a, u obtenerse del, análisis multidimensional. En algunos casos, el análisis multidimensional se realiza utilizando una combinación de biomarcadores que han demostrado, o no, ser estadísticamente significativos para diferenciar dos o más grupos diferentes, p. ej., grupos de tratamiento o grupos de pacientes. Por ejemplo, en algunos casos, se puede utilizar un primer biomarcador combinado con un segundo biomarcador en donde no se ha demostrado que el primer biomarcador diferencia estadísticamente dos grupos diferentes de forma independiente y se ha demostrado que el segundo biomarcador diferencia estadísticamente dos grupos de tratamiento o grupos de pacientes diferentes de manera independiente, o viceversa. En algunos casos en los que se utilizan dos biomarcadores combinados que no diferencian estadísticamente de forma independiente dos grupos diferentes, la combinación de marcadores puede diferenciar estadísticamente dos grupos diferentes. En otros casos en los que se utilizan dos biomarcadores combinados que diferencian de forma independiente, p. ej., diferencian estadísticamente, diferentes grupos, la combinación de marcadores puede diferenciar más significativamente los diferentes grupos.

35 En ciertos casos, una firma de biomarcador de TB puede incluir uno o más subgrupos o subpoblaciones o proporciones de una población de una muestra particular identificados, evaluados o medidos que tienen una característica compartida o un aspecto particular compartido que pueden variar dentro de la muestra. Por "subgrupo" o "subpoblación" o "proporción", utilizados indistintamente en el presente documento, se entiende una porción de un grupo más grande o una población más grande de una muestra que se diferencia del grupo más grande o de la población más grande por una o más características comunes o aspectos comunes. Por ejemplo, una subpoblación puede compartir un biomarcador o característica o nivel de biomarcador categórico comunes, incluyendo, p. ej., el nivel de expresión del biomarcador. En algunos casos, una característica común o un aspecto común de un subgrupo o subpoblación pueden estar relacionados con un biomarcador compartido, incluyendo, pero sin limitarse a, la presencia o ausencia compartida de un biomarcador en particular, el nivel compartido de un biomarcador en particular, la expresión compartida de un biomarcador en particular, el cambio compartido en el nivel de un biomarcador en particular, el cambio compartido en la expresión de un biomarcador en particular, etc. En algunas realizaciones, una característica común o un aspecto común de un subgrupo o subpoblación pueden no estar relacionados con un biomarcador y pueden ser algún otro aspecto de las unidades individuales del subgrupo o subpoblación. Otros aspectos, es decir, aspectos que no son biomarcadores de TB, de las unidades individuales del subgrupo de subpoblación pueden variar y pueden ser cualquier aspecto conveniente de las unidades individuales que se puede determinar, visualizar, detectar, medir, categorizar, etc.

50 En ciertos casos, una población, de la que forman parte una o más subpoblaciones, puede ser una población de células, p. ej., células de una muestra celular o una parte de las células de una muestra celular. Las subpoblaciones de células dentro de una población pueden o no ser mutuamente excluyentes, es decir, tales subpoblaciones se pueden solapar o no y, en algunos casos, se pueden solapar de 1% a 100%, incluyendo, p. ej., de 1% a 10%, de 10% a 20%, de 20% a 30%, de 30% a 40%, de 40% a 50%, de 50% a 60%, de 60% a 70%, de 70% a 80%, de 80% a 90%, de 90% a 100%, de 1% a 50%, de 50% a 100%, 90%, 95%, 100%, etc.

55 Las subpoblaciones celulares de células variarán en los aspectos o características comunes o compartidos que definen subpoblaciones particulares. En algunos casos, los aspectos que pueden definir una subpoblación celular incluyen pero no se limitan a, p. ej., el tamaño de la célula, la forma de la célula, la granularidad de la célula, la opacidad de la célula, la razón entre el núcleo celular y el citoplasma, el contenido celular (p. ej., la presencia o ausencia o la cantidad de orgánulos o biomoléculas o compuestos intercelulares particulares (p. ej., el contenido de ácido nucleico, el contenido de lípidos, el contenido de carbohidratos, etc.)), la química intercelular (p. ej., el pH intercelular), el contenido de la superficie celular (p. ej., la presencia o ausencia o cantidad de componentes de la membrana celular particulares (p. ej., proteínas de la superficie celular, lípidos de la superficie celular, carbohidratos de la superficie celular, etc.)). En algunos casos, una subpoblación celular puede estar definida por la presencia o ausencia o el nivel, incluyendo el

nivel de expresión, o el cambio de uno o más biomarcadores particulares. En algunas realizaciones, las células de una subpoblación que tiene algún nivel de expresión de biomarcador se pueden categorizar en función de un umbral de expresión de biomarcador establecido como se describe en otra parte del presente documento.

- 5 La diferencia en la expresión de biomarcadores entre dos células que pertenecen a dos subpoblaciones de células diferentes separadas por un umbral de biomarcador, que se describe a continuación, o la diferencia media en la expresión de biomarcadores entre dos subpoblaciones de células variará. En algunos casos, p. ej., como se mide en términos de la fluorescencia relativa de un biomarcador particular analizado por citometría de flujo, la expresión del biomarcador entre dos células que pertenecen a diferentes subpoblaciones puede oscilar más de 7 log. Por ejemplo, en algunos casos, una célula de una primera subpoblación puede tener un nivel de expresión de biomarcadores, p. ej., detectado utilizando indicadores fluorescentes como se describe en el presente documento, que es diferente de la expresión de biomarcadores de una célula de una segunda subpoblación en cualquier lugar de 0,1 a 10^7 veces, incluyendo pero sin limitarse a, p. ej., de 0,1 a 1 vez, de 0,1 a 10 veces, de 0,1 a 10^2 veces, de 0,1 a 10^3 veces, de 0,1 a 10^4 veces, de 0,1 a 10^5 veces, de 0,1 a 10^6 veces, de 1 a 10 veces, de 1 a 10^2 veces, del 1 al 10^3 veces, del 1 al 10^4 veces, del 1 al 10^5 veces, del 1 al 10^6 veces, del 1 al 10^7 veces, de 10 a 10^2 veces, de 10 a 10^3 veces, de 10 a 10^4 veces, de 10 a 10^5 veces, de 10 a 10^6 veces, de 10 a 10^7 veces, de 10 a 10^8 veces, de las 10^2 a 10^4 veces, de las 10^2 a 10^5 veces, de 10^2 a 10^6 veces, de las 10^2 a 10^7 veces, de 10^3 a 10^4 veces, de 10^3 a 10^5 veces, de 10^3 a 10^6 veces, de 10^3 a 10^7 veces, de 10^4 a 10^5 veces, de 10^4 a 10^6 veces, de 10^4 a 10^7 veces, de 10^5 a 10^6 veces, de 10^5 a 10^7 veces, y de 10^6 a 10^7 veces.
- 10 En algunos casos, se puede determinar el número de células que tienen un nivel de biomarcador por encima o por debajo de un nivel umbral de biomarcador particular, p. ej., para determinar adicionalmente la proporción de células que tienen un nivel de biomarcador por encima o por debajo de un umbral particular de una población de muestra particular. En ciertos casos, el tamaño de una subpoblación de células o la proporción de células de una población de muestra en particular se pueden utilizar para determinar la firma de un biomarcador de TB y hacer una evaluación de TB. En algunas realizaciones, el tamaño de una sola subpoblación de células o una sola proporción de células de una población de muestra particular que tiene un nivel de biomarcador por encima o por debajo de un umbral particular puede constituir una firma de biomarcador. En otras realizaciones, el tamaño de múltiples subpoblaciones de células o múltiples proporciones de células de una población de muestra particular que tiene niveles de biomarcadores por encima o por debajo de umbrales particulares constituye una firma de biomarcador. El número de subpoblaciones de células medidas y/o identificadas de proporciones de células de una población de muestra particular utilizada para producir una firma de biomarcador puede variar y, en algunos casos, puede variar de 1 a 200, incluyendo, p. ej., 1 a 100, 1 a 50, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 5 a 15, 2 a 10, 5 a 10, 7 a 10, 3 a 10, 3 a 7, 3 a 5, etc.
- 15 En algunos casos, al determinar una firma de biomarcador de TB, se pueden determinar una o más segundas subpoblaciones de una o más primeras subpoblaciones. Por ejemplo, en algunos casos, se determina una primera subpoblación que expresa un primer biomarcador por encima o por debajo de un umbral particular y se determina una segunda subpoblación dentro de la primera subpoblación que expresa un segundo biomarcador por encima o por debajo de un umbral particular. Tal análisis se puede describir en ciertos casos como expresión conjunta de biomarcadores y se puede utilizar para determinar una subpoblación de células que expresan dos o más marcadores por encima o por debajo de ciertos niveles umbral. En algunos casos, se puede determinar una subpoblación que expresa un primer biomarcador por encima de cierto umbral y un segundo marcador por debajo de cierto umbral y se puede describir, p. ej., como una subpoblación celular que es "positiva" para un primer marcador y "negativa" para un segundo marcador. También se contemplan subpoblaciones que son "doble positivas" o "doble negativas" según corresponda. Tal análisis no se limita a dos niveles de subpoblaciones, es decir, dos subpoblaciones o dos biomarcadores y, en algunos casos, puede consistir en muchos niveles de subpoblaciones que incluyen una variedad de biomarcadores. El número de subpoblaciones y biomarcadores utilizado en tales análisis variará y, en algunos casos, puede ser, pero no se limita a, de 3 a 20, incluyendo, p. ej., 3 a 19, 3 a 18, 3 a 17, 3 a 16, 3 a 15, 3 a 14, 3 a 13, 3 a 12, 3 a 11, 3 a 10, 3 a 9, 3 a 8, 3 a 7, 3 a 6, 3 a 5 y 3 a 4. En consecuencia, las subpoblaciones pueden tener cualquier combinación de presencia o ausencia de biomarcadores por encima o por debajo de determinados niveles umbral, incluyendo, p. ej., "positiva" para un primer biomarcador, "negativa" para un segundo biomarcador y "positiva" para un tercer biomarcador, o "triple positiva" o "triple negativa", etc. Tal análisis no se limita a distintas subpoblaciones y, en algunos casos, las subpoblaciones se pueden solapar o una subpoblación puede no estar completamente contenida dentro de una o más subpoblaciones de nivel superior.

Biomarcadores de TB

- 55 En algunos aspectos de la presente divulgación, se proporcionan biomarcadores para realizar una evaluación de TB y para su uso en la producción de una firma de biomarcador para realizar una evaluación de TB. Por "biomarcador", o en algunos casos simplemente "marcador", se entiende cualquier factor molecular, químico o fisiológico cuya representación en una muestra está asociada con un fenotipo clínico o resultado clínico. Por ejemplo, un biomarcador de TB se puede representar de manera diferencial en una muestra de un sujeto que tiene LTBI en comparación con un sujeto con ATB, un sujeto que tiene TB en comparación con un individuo sano, un sujeto que tiene TB en comparación con un sujeto que no tiene una enfermedad pulmonar por TB, un sujeto en transición entre LTBI y ATB, tal como de LTBI a ATB, un sujeto que responde a la terapia contra TB en comparación con un sujeto que no responde a la terapia contra TB, un sujeto que requiere terapia contra TB en comparación con un sujeto que no requiere terapia contra TB, o un sujeto que requiere terapia adicional contra TB en comparación con un sujeto que no requiere terapia

adicional contra TB o, etc.

Los agentes específicos que se pueden evaluar como biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, p. ej., polipéptidos (p. ej., péptidos, proteínas, lipoproteínas, etc.), carbohidratos, lípidos, metabolitos, aminoácidos, electrolitos, ácidos nucleicos (p. ej., ADN, ARNm, microARN, etc.) y similares. Los biomarcadores útiles para evaluar la TB o

5 complementar las evaluaciones de la TB pueden estar asociados con células, es decir, "biomarcadores celulares", o no asociados con células, es decir, "biomarcadores no asociados a células". En algunos casos, los biomarcadores no asociados a células incluyen biomarcadores solubles del anfítrión, p. ej., marcadores del suero del anfítrión. Por 10 "marcadores del suero del anfítrión se entienden aquellos marcadores presentes en el suero de un sujeto que se pueden utilizar para diagnosticar una enfermedad o infección, evaluar el estado patológico o controlar la progresión de la enfermedad o la eficacia del tratamiento. En ciertos casos, los biomarcadores adicionales pueden incluir 15 características del sujeto o del paciente, incluyendo, p. ej., características fisiológicas (p. ej., volumen en sangre, presión arterial, frecuencia cardíaca, pH de la sangre, oxígeno en sangre, consumo de oxígeno, frecuencia respiratoria, metabolismo basal, temperatura corporal, equilibrio hídrico, densidad de la orina, proteinuria, aminoaciduria, creatinuria, etc.) o características conductuales (p. ej., función verbal, función visual, función olfativa, función auditiva, función táctil, función de memoria, movilidad, etc.). La presencia, ausencia o nivel (p. ej., nivel alto o bajo) de un biomarcador adicional en particular o un cambio en un biomarcador en particular, incluyendo, p. ej., un cambio en el 20 nivel del biomarcador o en la expresión del biomarcador (es decir, aumento del nivel o expresión o disminución del nivel o expresión), como se incluyen en las evaluaciones de TB, pueden estar correlacionados con un diagnóstico o una evaluación clínica de TB en particular. Tales biomarcadores adicionales se describen con mayor detalle a continuación.

Aquellos biomarcadores expresados por un anfítrión, p. ej., expresados por células anfítrionas o expresados en células anfítrionas, se pueden denominar biomarcadores del anfítrión. En algunos casos, los biomarcadores del anfítrión que son expresados de manera diferencial por un anfítrión infectado con TB o un sujeto que tiene la enfermedad TB en comparación con un sujeto no infectado o un sujeto que no tiene la enfermedad de TB se denominan biomarcadores 25 de TB del anfítrión. Los biomarcadores de TB del anfítrión se pueden detectar, medir o evaluar mediante cualquier método conveniente, incluyendo los métodos descritos anteriormente para los biomarcadores.

Los biomarcadores en cuestión útiles para realizar una evaluación de la presente divulgación incluyen, p. ej., citocinas, receptores de citocinas y marcadores de inflamación. Las citocinas y los receptores de citocinas son importantes para que la señalización celular influya en el comportamiento de otras células, pero generalmente no son hormonas ni 30 factores de crecimiento. En algunos casos, las citocinas o sus receptores que son útiles como biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, quimiocinas, interferones, interleucinas, linfocinas, factor de necrosis tumoral y similares. Tales citocinas se producen en una amplia gama de células diferentes que incluyen, pero no se limitan a, células inmunitarias, macrófagos, linfocitos B, linfocitos T, mastocitos y similares. Tales citocinas también se producen en 35 células no inmunitarias o células que no son necesariamente células inmunitarias, p. ej., células endoteliales, fibroblastos, células estromales y similares.

En ciertas realizaciones, los biomarcadores de interés incluyen marcadores o combinaciones de marcadores detectados por la óptica y/o la electrónica de un citómetro de flujo. En algunos casos, tales marcadores son antígenos de superficie, p. ej., proteínas, expresados o presentados sobre la superficie de una célula y utilizados para identificar una subpoblación de células basándose en niveles de expresión similares del mismo marcador o marcadores. En otros 40 casos, tales marcadores son características celulares que se pueden detectar mediante la óptica y/o la electrónica de un citómetro de flujo, como se describe en el presente documento. Los marcadores de interés incluyen aquellos marcadores descritos en el presente documento que muestran niveles de expresión significativamente diferentes en varios grupos de tratamiento, p. ej., grupos en varios puntos de tiempo después del inicio del tratamiento, y grupos de control, p. ej., controles sanos o controles que tienen otras enfermedades pulmonares, después de la corrección de 45 Bonferroni, aquellos que muestran niveles de expresión significativamente diferentes en varios grupos de tratamiento y control mediante cualquier método estadístico utilizado en el presente documento, y aquellos que muestran tendencias de expresión en los grupos de tratamiento y/o control independientemente de la significación estadística.

En algunos casos, los biomarcadores útiles para determinar la firma de un biomarcador de TB para diagnosticar TB 50 en un sujeto son aquellos biomarcadores de TB del anfítrión que están presentes por encima o por debajo de un nivel umbral en una subpoblación de células de una muestra celular obtenida de sujetos que se sospecha que tienen TB. Por ejemplo, en algunos casos, el nivel de un biomarcador de TB del anfítrión se mide y se utiliza para determinar el tamaño relativo de una subpoblación de células de una muestra celular obtenida de un sujeto que se sospecha que tiene TB y el tamaño de la subpoblación se compara con una preferencia de control sana. En algunas realizaciones, el tamaño relativo de la subpoblación de células que tienen expresión del biomarcador de TB del anfítrión por encima 55 de un umbral particular en sujetos que se sospecha que tienen TB es menor que el del patrón de referencia.

Como se revisó anteriormente, los aspectos de los métodos incluyen analizar una muestra activada con tuberculosis (TB) del sujeto para al menos uno de: Células T CD154⁺ y células T que tienen un fenotipo de memoria central (CM), tal como un fenotipo CM1, CM2 o CM3. Como tal, en algunos casos, un biomarcador específico de interés es CD154 (es decir, ligando de CD40 o CD40L, Núm. Uniprot P29965 (humano) o P27548 (ratón)). Además de, o en lugar de, 60 CD154, se pueden emplear otros biomarcadores indicativos de activación de células T (es decir, asociados con células T activadas), donde tales marcadores incluyen, pero no se limitan a: IFN-γ, CD69, TNF-α y similares.

Además de emplear un biomarcador de células T activadas, p. ej., CD154, un ensayo dado puede incluir el uso de biomarcadores que identifiquen un subconjunto particular de células T de memoria, p. ej., un fenotipo de memoria central (CM), tal como un fenotipo de memoria central 1 (CM1) (CD45RA⁻, CD197(CCR7)⁺, CD27⁺, CD28⁺) correspondiente a infección tuberculosa latente (LTBI), un fenotipo de memoria central 2 (CM2) (CD45RA⁻, CD197(CCR7)⁺, CD27⁺, CD28⁺) correspondiente a la aparición de tuberculosis activa subclínica (ATB) o un fenotipo de memoria central 3 (CM3) (CD45RA⁻, CD197 (CCR7), CD27⁺, CD28⁺) correspondiente a una ATB subclínica más avanzada. Tales biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, CD45RA, CD197 (CCR7), CD27, CD28, CD57 y similares. Además de, o como alternativa a, los biomarcadores de identificación CM1/CM2/CM3, se pueden emplear otros biomarcadores que pueden distinguir LTBI de ATB, donde tales biomarcadores incluyen, pero no se limitan a: IL-2, TNF- α , Ki-67, HLA-D4, CD-38, CXCR3, CCR6, CD161, razón de linfocitos/monocitos, etc. En algunos casos, los biomarcadores empleados para obtener una firma de biomarcadores de TB incluyen CD154 además de CD45RA, CD197 (CCR7), CD27, CD28, p. ej., en aquellas realizaciones en las que se analiza una muestra activada con tuberculosis (TB) del sujeto para determinar células T CD154⁺ y células T que tienen un fenotipo de memoria central, tal como un fenotipo CM1, CM2 o CM3. En algunos casos, los biomarcadores empleados para obtener una firma de biomarcador de TB incluyen CD154 además de uno o más de IL-2, TNF- α , Ki-67, HLA-D4, CD-38, CXCR3, CCR6, CD161. En algunos casos, los biomarcadores empleados para obtener una firma de biomarcador de TB incluyen CD69 y/o IFN- γ , además de CD45RA, CD197 (CCR7), CD27, CD28, CD57. En algunos casos, los biomarcadores empleados para obtener una firma de biomarcador de TB incluyen CD154 además de CD45RA, CD197 (CCR7), CD27, CD28, así como uno o más de: CD69, IFN- γ , IL-2, TNF- α , Ki-67, HLA-D4, CD38, CXCR3, CCR6 y CD161.

20 *Muestras activadas con TB*

Como se resumió anteriormente, los aspectos de los métodos incluyen analizar una muestra activada con tuberculosis (TB) de un sujeto para obtener la firma del biomarcador de TB. Las muestras activadas con TB son muestras celulares. Las muestras celulares a partir de las cuales se puede identificar, evaluar o medir una subpoblación de células pueden variar e incluyen cualquier muestra obtenida de un sujeto que contenga células. Las muestras celulares se pueden obtener de cualquier manera conveniente e incluyen, pero no se limitan a, p. ej., sangre, biopsia de tejido, incluida la biopsia por punción, biopsia de médula ósea, aspirado bronquial, líquido cefalorraquídeo, esputo u otros fluidos corporales. En algunos casos, la muestra celular empleada en los métodos de la invención puede no procesarse o tomarse directamente del sujeto y utilizarse en el análisis, incluyendo, p. ej., una muestra de sangre completa. En otros casos, se puede obtener una muestra celular procesando una muestra obtenida de un paciente, incluyendo, p. ej., el aislamiento de células de la muestra, la concentración de las células de la muestra, la disociación de las células de la muestra. En algunos casos, la muestra celular es una muestra de sangre o una muestra de sangre procesada, incluyendo, p. ej., una preparación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), una preparación de suero, una preparación de células inmunitarias, etc.

En algunas realizaciones, la muestra celular se puede obtener de un sujeto no sometido a tratamiento previo o de un sujeto que no ha tenido ninguna intervención médica o farmacológica previa, p. ej., que no ha tenido ninguna intervención médica o farmacológica relacionada con la evaluación, el diagnóstico o el tratamiento de una enfermedad, incluyendo, p. ej., una evaluación de TB o un tratamiento contra TB. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un paciente tratado o un paciente que ha tenido alguna cantidad de intervención médica o farmacológica previa, incluyendo, p. ej., tratamiento para un trastorno, p. ej., un trastorno pulmonar, o una infección, p. ej., una infección por TB, o tratamiento contra la TB, incluyendo, p. ej., los tratamientos contra la TB descritos en el presente documento.

Las muestras empleadas en las realizaciones de los métodos son muestras activadas con TB. Por muestra activada con TB se entiende una muestra celular que es una muestra estimulada con antígeno de TB. La estimulación con antígeno se puede realizar antes de la recolección de la muestra, p. ej., la estimulación con antígeno se puede realizar en el sujeto poniendo en contacto el sujeto con el antígeno y recogiendo a continuación la muestra después de la estimulación con antígeno, o después de la recolección de la muestra, p. ej., la estimulación con antígeno se puede realizar en cultivo una vez que las células de la muestra han sido aisladas del sujeto. La estimulación con antígeno se realiza utilizando cualquier antígeno conveniente, incluyendo antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Los antígenos de MTB específicos que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a: ESAT-6, CFP-10, MTB66, etc.

Cuando se deseé, se puede poner en contacto adicionalmente una muestra de un sujeto con un reactivo coestimulador de células T para producir la muestra activada con TB. Se puede emplear cualquier reactivo coestimulador de células T conveniente, en donde tales reactivos pueden incluir uno o más agentes estimuladores de células T, incluyendo, pero sin limitarse a, miembros de unión específica, p. ej., anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos, a uno o más de: CD28, CD49d y similares. Los reactivos coestimuladores de células T disponibles en el mercado que se pueden emplear para preparar una muestra celular activada con TB incluyen, pero no se limitan a: Reactivo Coestimulador CD28/CD49d de BD Biosciences (un anticuerpo monoclonal de ratón (clon L25, L293) generado utilizando la molécula CD49d, CD28, IA4, Tp44, ITGA4, CD28, Integrina, alfa 4 (antígeno CD49D, subunidad alfa 4 del receptor VLA-4) como antígeno); CD28 y CD49d juntos o solos y similares.

Cuando se deseé, se puede poner en contacto una muestra con uno o más reactivos adicionales. Por ejemplo, se puede poner en contacto una muestra con un inhibidor de secreción. Se puede emplear cualquier inhibidor de secreción conveniente, donde los ejemplos de inhibidores de secreción incluyen, pero no se limitan a: Brefeldina-A (BFA), Monensina y similares.

Cuando se desee, se puede combinar un reactivo de detección de biomarcadores con la muestra durante la preparación de la muestra activada con TB. Por ejemplo, se puede combinar un reactivo de detección de biomarcadores de activación de células T con la muestra inicial obtenida del sujeto durante la preparación de la muestra activada con TB. Como se revisó anteriormente, los biomarcadores de activación de células T incluyen

5 CD154, IFN- γ , CD69, TNF α y similares, donde los ejemplos de reactivos que se pueden emplear para detectar estos biomarcadores se describen con mayor detalle a continuación. Por ejemplo, cuando se analiza CD154, se puede combinar un miembro de unión específica de CD154 marcado, p. ej., un anticuerpo de CD154 marcado con fluorescencia, con la muestra durante la preparación de la muestra activada con TB.

10 Al preparar la muestra activada con TB, la muestra inicial se combina con el activador de TB, tal como un antígeno de MTB (p. ej., como se ha descrito anteriormente) y cualquier otro reactivo deseado, p. ej., reactivos coestimuladores, inhibidores de secreción, reactivos de detección de biomarcadores, etc., y se mantiene durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca la muestra activada con TB deseada. Al preparar la muestra activada con TB, los reactivos y las muestras se pueden poner en contacto y se pueden combinar a una temperatura que varía de 15 a 50, tal como de 20 a aproximadamente 40°C, p. ej., de 35 a 40°C, tal como 37°C. El contacto se 15 puede realizar mediante mezclado o agitación, p. ej., con agitación vortical, etc., para proporcionar una combinación suficiente de los reactivos y la muestra. La mezcla de reacción resultante se puede mantener o incubar después durante un período de tiempo suficiente para activar la muestra. En algunos casos, la mezcla de reacción se incuba a una temperatura que varía de 15 a 50, tal como de 20 a aproximadamente 40°C, p. ej., de 35 a 40°C, tal como 37°C, durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 30 minutos a 72 horas, tal como de 3 horas a 36 horas, 20 incluyendo de 6 horas a 24 horas. Después de la etapa de incubación anterior, la muestra activada con TB resultante se puede analizar inmediatamente o se puede almacenar para su análisis en un momento posterior. Si se almacena, en algunas realizaciones, la muestra se almacena a una temperatura reducida; p. ej., sobre hielo.

25 Después de la preparación de la muestra activada con TB, la muestra activada con TB se puede tratar para lisar los glóbulos rojos. Se puede emplear cualquier agente de lisis conveniente, incluyendo, pero sin limitarse a, cloruro de amonio, un tampón de lisis, etc., cuando estén disponibles comercialmente tampones de lisis adecuados.

30 En ciertas realizaciones, los métodos pueden incluir la fijación de la muestra, por ejemplo, antes de ponerla en contacto con uno o más miembros de unión específica. Las células de la muestra se pueden fijar mediante la exposición a cualquiera de varios agentes fijadores de células (es decir, reactivos de fijación), tales como paraformaldehído, glutaraldehído, metanol, acetona, formalina o cualquier combinación de los mismos. Se pueden emplear otros fijadores y métodos de fijación, según se deseé. El tiempo de fijación puede variar y, en algunos casos, oscila entre 1 minuto y 1 hora, tal como 5 minutos y 30 minutos. La temperatura a la que tiene lugar la fijación puede variar y, en algunos casos, la temperatura oscila entre -30°C y 40°C.

35 En ciertos aspectos, la muestra se puede tratar con un agente de permeabilización antes de poner en contacto la muestra con un miembro de unión específica del marcador intracelular. La permeabilización puede permitir que un miembro de unión específica de un marcador intracelular penetre en las células de la muestra. La permeabilización puede tener lugar antes, después o al mismo tiempo que la fijación descrita anteriormente. Las células de la muestra se pueden permeabilizar mediante la exposición a cualquiera de varios agentes permeabilizantes celulares, tales como metanol, acetona o un detergente (p. ej., tritón, NP-40, saponina, tween 20, digitonina, leucoperma, etc.), o una combinación de los mismos. El tiempo de permeabilización puede variar y, en algunos casos, oscila entre 1 minuto y 40 1 hora, tal como entre 5 minutos y 30 minutos. La temperatura a la que tiene lugar la permeabilización puede variar y, en algunos casos, la temperatura puede oscilar entre 0°C y 50°C. En ciertos aspectos, las células de la muestra celular no se permeabilizan antes de que la muestra entre en contacto con el miembro de unión específica del marcador de superficie de la célula.

45 En algunos casos, las muestras utilizadas para realizar la evaluación de TB son muestras de nueva aportación, p. ej., muestras recolectadas del sujeto en el plazo de 1 a 5 días, incluyendo, p. ej., en el plazo de 5 días, en el plazo de 4 días, en el plazo de 3 días, en el plazo de 2 días y en el plazo de 1 día. En algunos casos, las muestras utilizadas para realizar la evaluación de TB son muestras recolectadas previamente. Las muestras recolectadas previamente se pueden almacenar en condiciones adecuadas antes del análisis y se pueden procesar, p. ej., repartir, incluyendo, p. ej. la eliminación o el reparto de un componente o una porción de una muestra de sangre en particular, o pueden no procesarse antes del almacenamiento. En algunos casos, las condiciones de almacenamiento apropiadas incluyen almacenamiento en refrigerador, incluyendo, p. ej., almacenamiento por debajo de la temperatura ambiente, pero por encima de la temperatura de congelación, incluyendo, p. ej., almacenamiento entre 21°C y 1°C, entre 10°C y 1°C, entre 10 y 4°C. C, etc. En algunos casos, la refrigeración puede incluir el almacenamiento de las muestras sobre hielo. En algunos casos, las condiciones de almacenamiento apropiadas incluyen condiciones de congelación, incluyendo, 50 p. ej., congelación a temperaturas que oscilan entre 0°C y -200°C, incluyendo, p. ej., almacenamiento de 0°C a -10°C, de 0°C a -20°C, de -20°C a -50°C, de -20°C a -60°C, de -20°C a -70°C, de -60°C a -80°C, de -60°C a -90°C C, de -60°C a -100°C, de -60°C a -110°C, de -60°C a -120°C, de -120°C a -130°C, de -120°C a -140°C C, de -120°C a -150°C, de -120°C a -160°C, de -120°C a -170°C, de -120°C a -180°C, de -120°C a -190°C C, de -120°C a -200°C, etc.

Detección de biomarcadores

60 Como se revisó anteriormente, los aspectos de los métodos incluyen analizar la muestra activada con TB para

determinar uno o más biomarcadores con el fin de obtener una firma de biomarcador de TB para la muestra. En ciertos casos, la detección de biomarcadores implica la evaluación o valoración del nivel de un biomarcador. El nivel de un biomarcador puede, en algunos casos, hacer referencia al nivel de biomarcador. Por "nivel de un biomarcador" o "nivel de biomarcador" se entiende el nivel en el que un biomarcador particular está presente en una muestra y puede incluir,

5 pero no se limita a, p. ej., el nivel de un biomarcador soluble en un fluido corporal, el nivel de un biomarcador celular presente en una muestra, el nivel de un biomarcador celular presente dentro de una célula, el nivel de un biomarcador celular presente sobre una célula, el nivel de un biomarcador celular presente sobre la superficie de una célula, el nivel de un biomarcador celular presente sobre una membrana celular. En algunos casos, el nivel de un biomarcador puede hacer referencia a la abundancia relativa de ARN, ADN o a la abundancia de proteínas o niveles de actividad. El nivel 10 de un biomarcador se puede evaluar, determinar o medir mediante cualquier método conveniente, incluyendo, pero sin limitarse a, p. ej., chips genéticos, matrices de genes, cuentas, PCR multiplex, PCR cuantitativa, ensayos continuos, análisis de transferencia Northern, análisis de transferencia Western, expresión de proteínas, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), estudios de 15 quimioluminiscencia, ensayos enzimáticos o cualquier otro método, aparato y sistema para la determinación y/o el análisis de la expresión que estén fácilmente disponibles comercialmente.

En ciertas realizaciones, la detección de biomarcadores y/o la medición de los niveles de biomarcadores se realizan mediante citometría de flujo. La citometría de flujo es una técnica para contar, examinar y clasificar partículas microscópicas suspendidas en una corriente de fluido. Permite el análisis multiparamétrico simultáneo de las 20 características físicas y/o químicas de células individuales que fluyen a través de un aparato de detección óptica y/o electrónica. La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un tipo especializado de citometría de flujo. FACS proporciona un método para clasificar una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más recipientes, generalmente una célula cada vez, en función de las características específicas de dispersión de luz y fluorescencia de cada célula. El citómetro de flujo y la máquina de FACS son aparatos científicos útiles, ya que 25 proporcionan un registro rápido, objetivo y cuantitativo de señales, p. ej., señales fluorescentes y/o la detección de características celulares, p. ej., tamaño, granularidad, viabilidad, etc., de células individuales, así como la separación física de células de particular interés. Las señales fluorescentes utilizadas en la citometría de flujo, por ejemplo, al cuantificar y/o clasificar las células por cualquier marcador presente sobre o en la célula, suelen ser preparaciones de 30 anticuerpos etiquetados con fluorescencia o ligandos etiquetados con fluorescencia para que se unan a anticuerpos u otros agentes específicos de抗ígenos, epítopos o ligandos, tales como sistemas de unión de biotina/avidina o cuentas marcadas con fluorescencia y opcionalmente direccionables (p. ej., microesferas o microcuentas). Los marcadores o combinaciones de marcadores detectados por la óptica y/o la electrónica de un citómetro de flujo varían y, en algunos casos incluyen, pero no se limitan a: marcadores de superficie celular,抗ígenos intracelulares y nucleares, ADN, ARN, pigmentos celulares, metabolitos celulares, modificaciones de proteínas, proteínas transgénicas, actividad enzimática, indicadores de apoptosis, viabilidad celular, estado oxidativo celular, etc.

35 En ciertos casos, la citometría de flujo se realiza utilizando un reactivo de detección, p. ej., un miembro de unión específica marcado, tal como un anticuerpo marcado con fluorocromo, p. ej., un anticuerpo monoclonal, que se une específicamente a un抗ígeno biomarcador de interés de una célula, p. ej., un biomarcador presente sobre la superficie de una célula. Como se revisó anteriormente, los biomarcadores que se pueden analizar en un caso dado incluyen uno o más de, incluyendo dos o más de, p. ej., tres o más de, tal como cuatro o más de CD154, CD45RA, 40 CD197 (CCR7), CD27, CD28, CD69, IFN-γ, IL-2, TNF-α, Ki-67, HLA-D4, CD-38, CXCR3, CCR6 y CD161. Los biomarcadores adicionales que se pueden analizar incluyen biomarcadores de identificación de células T, p. ej., CD3, CD4 y/o CD8, etc.

45 Para las realizaciones de la presente invención es adecuada una variedad de miembros de unión específica que se unen específicamente a los biomarcadores de interés en un ensayo dado. En cualquiera de las realizaciones anteriores, uno o más de los miembros de unión específica (p. ej., miembros de unión para CD154, CD45RA, CD197(CCR7), CD27, CD28, CD69, IFN-γ, IL-2, TNF-α, Ki-67, HLA-D4, CD-38, CXCR3, CCR6, CD161, CD3, CD4 y/o CD8) pueden incluir un dominio de unión específica. Los términos "unión específica", "específico para", "se une específicamente" y similares, se refieren a la unión preferencial de un miembro de unión a una diana particular (p. ej., a un tipo de célula, a un marcador extracelular o intracelular específico, etc.). El dominio de unión específica se puede unir (p. ej., de forma covalente o no covalente) a un epítopo específico sobre o dentro de la célula. En ciertos aspectos, un dominio de unión específica se une de forma no covalente a una diana. En tales casos, la asociación del dominio de unión específica con la diana de unión (p. ej., CD77) se puede caracterizar por una KD (constante de disociación) de 10^{-5} M o menos, 10^{-6} M o menos, tal como 10^{-7} M o menos, incluyendo 10^{-8} M o menos, p. ej., 10^{-9} M o menos, 10^{-10} M o menos, 10^{-11} M o menos, 10^{-12} M o menos, 10^{-13} M o menos, 10^{-14} M o menos, 10^{-15} M o menos, incluyendo 10^{-16} M o menos. Se puede emplear una variedad de diferentes tipos de dominios de unión específica. Los dominios de unión específica de interés incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, proteínas, péptidos, haptenos, ácidos nucleicos, etc. El término "anticuerpo", como se emplea en el presente documento, incluye anticuerpos policlonales o monoclonales o fragmentos de los mismos que son suficientes para unirse a una diana de interés. El término "anticuerpo" también incluye fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab monoméricos, fragmentos Fab' monoméricos o fragmentos F(ab')2 diméricos. También se encuentran dentro del alcance del término "anticuerpo" las moléculas producidas por ingeniería de anticuerpos, tales como moléculas de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) o anticuerpos químéricos o humanizados producidos a partir de anticuerpos monoclonales mediante el reemplazo de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera para producir anticuerpos químéricos o el remplazo tanto de

las regiones constantes como de las porciones marco de las regiones variables para producir anticuerpos humanizados.

Como se indicó anteriormente, los reactivos de detección están marcados. Por marcado se entiende que los reactivos de detección incluyen un radical detectable, tal como un radical fluorescente. Por ejemplo, un miembro de unión 5 específica dado se puede marcar de forma detectable con un colorante coloreado, una marca fosorescente, una marca fluorescente, una etiqueta de masa, una marca radiactiva o cualquier otra marca adecuada. Por ejemplo, el dominio marcador puede ser una marca fluorescente detectable basada, por ejemplo, en los máximos de emisión de fluorescencia, la polarización de la fluorescencia, el tiempo de vida de la fluorescencia, la dispersión de la luz o una combinación de los mismos. En ciertos aspectos, el dominio marcador puede ser un fluoróforo (es decir, una marca 10 fluorescente, un colorante fluorescente, etc.). Los fluoróforos se pueden seleccionar entre cualquiera de los muchos tintes adecuados para su uso en aplicaciones analíticas (p. ej., citometría de flujo, formación de imágenes, etc.).

Los ejemplos de fluoróforos que se pueden incorporar a las micropartículas incluyen, pero no se limitan a, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico; acridina y derivados tales como acridina, naranja de acridina, amarillo de acridina, rojo de acridina e isotiocianato de acridina; ácido 5-(2'-aminoethyl)aminonafaleno-1-sulfónico (EDANS); 3,5-disulfonato de 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida (amarillo Lucifer VS); N-(4-anilino-1-naftil)maleimida; antranilamida; Amarillo Brillante; cumarina y derivados tales como cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Coumarin 120), 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Coumaran 151); cianina y derivados tales como cianosina, Cy3, Cy5, Cy5.5 y Cy7; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5',5"-dibromopirogalol-sulfonaftaleína (Rojo de Bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; dietilaminocumarina; pentaacetato de 20 dietilentriamina; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico, ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, cloruro de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo), ácido 4-(4-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados tales como eosina e isotiocianato de eosina; eritrosina y derivados tales como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados tales como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2'7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), clorotriazinil fluoresceína, naftofluoresceína y QFITC (XRITC), fluorescamina, IR144, IR1446, Proteína Fluorescente Verde (GFP), Proteína Fluorescente de Coral de Arrecife (RCFP); Lissamine™; Lissamine rodamina, amarillo Lucifer; isotiocianato de Verde Malaquita; 4-metilumbelifera; ortocresolftaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Rojo Nilo; Verde Oregón; Rojo Fenol; B-ficoeritrina; o-ftaldialdehído; pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y butirato de 30 succinimidil-1-pireno; Rojo Reactivo 4 (Cibacron™ Rojo Brillante 3B-A); rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirodamina (R6G), 4,7-diclororodamina lisamina, rodamina B cloruro de sulfonilo, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulfurorodamina B, sulfurorodamina 101, derivado cloruro de sulfonilo de sulfurorodamina 101 (Rojo Texas), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), tetrametil rodamina e isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); riboflavina; derivados del quelato de terbio y ácido rosólico; 35 xanteno; o combinaciones de los mismos. La marca fluorescente se puede distinguir basándose en los máximos de emisión de fluorescencia y, opcionalmente, basándose adicionalmente en la dispersión o extinción de la luz. Los reactivos de detección útiles en citometría de flujo, p. ej., incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos, se pueden crear en el laboratorio utilizando métodos bien establecidos y están disponibles comercialmente, p. ej., de BD (Franklin Lakes, NJ) y BD Biosciences (San José, CA).

40 En algunos casos, el fluoróforo (es decir, el tinte) es un tinte polimérico (p. ej., un tinte polimérico fluorescente). Los tintes poliméricos fluorescentes que encuentran uso en los métodos y sistemas en cuestión son variados. En algunos casos del método, el tinte polimérico incluye un polímero conjugado. Los polímeros conjugados (CP) se caracterizan 45 por una estructura electrónica deslocalizada que incluye una cadena principal de enlaces insaturados (p. ej., enlaces dobles y/o triples) y enlaces saturados (p. ej., enlaces sencillos) alternos, donde los electrones π se pueden mover de un enlace a otro. Como tal, la cadena principal conjugada puede conferir una estructura lineal extendida al tinte polimérico, con ángulos de enlace limitados entre unidades repetidas del polímero. Por ejemplo, las proteínas y los ácidos nucleicos, aunque también son poliméricos, en algunos casos no forman estructuras de varillas extendidas, sino que se pliegan en formas tridimensionales de orden superior. Además, los CP pueden formar cadenas principales poliméricas de "varilla rígida" y experimentar un ángulo de torsión limitado (p. ej., torsión) entre las unidades repetidas 50 de monómero a lo largo de la cadena principal del polímero. En algunos casos, el tinte polimérico incluye un CP que tiene una estructura de varilla rígida. Las características estructurales de los tintes poliméricos pueden tener un efecto sobre las propiedades de fluorescencia de las moléculas.

55 Se puede utilizar cualquier tinte polimérico conveniente en los dispositivos y métodos en cuestión. En algunos casos, un tinte polimérico es un multicromóforo que tiene una estructura capaz de captar luz para amplificar la salida fluorescente de un fluoróforo. En algunos casos, el tinte polimérico es capaz de captar la luz y convertirla eficientemente en luz emitida a una longitud de onda más larga. En algunos casos, el tinte polimérico tiene un sistema multicromóforo captador de luz que puede transferir energía de manera eficiente a especies luminescentes cercanas (p. ej., un "cromóforo de señalización"). Los mecanismos para la transferencia de energía incluyen, por ejemplo, transferencia de energía resonante (p. ej., transferencia de energía de resonancia Forster (o fluorescencia), FRET), 60 intercambio de carga cuántica (transferencia de energía Dexter) y similares. En algunos casos, estos mecanismos de transferencia de energía tienen un alcance relativamente corto; es decir, la estrecha proximidad del sistema multicromóforo captador de luz al cromóforo de señalización proporciona una transferencia de energía eficiente. En condiciones de transferencia de energía eficiente, la amplificación de la emisión del cromóforo de señalización se

produce cuando el número de cromóforos individuales en el sistema multicromóforo captador de luz es grande; es decir, la emisión del cromóforo de señalización es más intensa cuando la luz incidente (la "luz de excitación") tiene una longitud de onda que es absorbida por el sistema multicromóforo captador de luz que cuando el cromóforo de señalización es excitado directamente por la luz de bombeo.

- 5 El multicromóforo puede ser un polímero conjugado. Los polímeros conjugados (CP) se caracterizan por una estructura electrónica deslocalizada y se pueden utilizar como indicadores ópticos altamente sensibles para dianas químicas y biológicas. Debido a que la longitud de conjugación efectiva es sustancialmente más corta que la longitud de la cadena polimérica, la cadena principal contiene una gran cantidad de segmentos conjugados muy próximos. Por lo tanto, los polímeros conjugados son eficientes para la captación de luz y permiten la amplificación óptica a través de la transferencia de energía Forster.

10 Los tintes poliméricos de interés incluyen, pero no se limitan a, los tintes descritos por Gaylord et al. en las Publicaciones de Estados Unidos Núm. 20040142344, 20080293164, 20080064042, 20100136702, 20110256549, 20120028828, 20120252986 y 20130190193; y por Gaylord et al., en J. Am. Chem. Soc., 2001, 123 (26), pág. 6417-6418; por Feng et al., en Chem. Soc. Rev., 2010, 39, 2411-2419; y por Traina et al., en J. Am. Chem. Soc., 2011, 133 (32), pág. 12600-12607.

15 Como se mencionó anteriormente, la muestra activada con TB se combina con reactivos de detección de biomarcadores marcados en condiciones suficientes para producir una muestra marcada. El contacto de la muestra con los reactivos de marcaje se realiza en condiciones de incubación que permiten la unión de los reactivos de marcaje a sus respectivos biomarcadores, si están presentes, en la muestra. En algunos casos, los componentes de la reacción y las muestras se ponen en contacto y se combinan a una temperatura que oscila entre 15 y 50°C, tal como entre 20 y aproximadamente 40°C. El contacto se puede realizar por medio de mezclado o agitación, p. ej., agitación vortical, etc., para proporcionar una combinación suficiente de los componentes de la reacción y la muestra. La mezcla de reacción resultante se puede mantener o incubar a continuación durante un período de tiempo antes del análisis de citometría de flujo. En algunos casos, la mezcla de reacción se incuba a una temperatura que varía de 15 a 50, tal como de 20 a aproximadamente 40°C durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 30 minutos a 72 horas, tal como de 1 hora a 24 horas, incluyendo 1 hora a 3 horas. Después de la etapa de incubación anterior, la muestra se puede analizar inmediatamente o se puede almacenar para un análisis posterior. Si se almacena, en algunas realizaciones, la muestra se almacena a una temperatura reducida; p. ej., sobre hielo.

20 A continuación, se puede cargar en un citómetro de flujo una muestra celular marcada, p. ej., como se ha descrito anteriormente, p. ej., cargando la muestra completa o una porción de la muestra no modificada en el citómetro de flujo o aislando primero las células de la muestra celular utilizando métodos de aislamiento conocidos en la técnica o descritos en el presente documento y resuspendiendo las células aisladas en un tampón adecuado, p. ej., tampón de elución. Las células cargadas en el citómetro de flujo se hacen pasar a través del citómetro de flujo, p. ej., mediante el flujo del tampón o la muestra líquida que contienen las células a través de la celda de flujo del citómetro de flujo. El citómetro de flujo detecta eventos cuando la célula pasa por una o más zonas de detección del citómetro de flujo. Por ejemplo, el citómetro de flujo puede detectar la fluorescencia emitida por un fluorocromo de un reactivo de detección tras la excitación del fluorocromo con una determinada longitud de onda de luz. En algunos casos, el citómetro de flujo detecta la intensidad relativa de una señal particular, p. ej., la fluorescencia de un reactivo de detección particular, de una célula particular, p. ej., cuantifica el nivel de un marcador presente sobre la superficie de la célula y/o categoriza cualitativamente la celda, p. ej., como una celda que es positiva para un marcador en particular o una celda que es negativa para un marcador en particular. El citómetro de flujo cuenta o evalúa de otro modo los eventos detectados sin la intervención de un operador y se utiliza para determinar, p. ej., el número total de células, el número o la proporción de células unidas a un reactivo de detección en particular, la presencia o cantidad total de una característica particular de una población celular, etc.

25 30 35 40 45 50 55 60

En algunos casos, el umbral de un biomarcador se determina haciendo una comparación del biomarcador en cuestión. Por ejemplo, se mide una primera población celular que se sabe que tiene un alto nivel de Biomarcador X, p. ej., en un citómetro de flujo, y se compara con una segunda población celular, que se sabe que tiene un bajo nivel de Biomarcador X y la comparación se utiliza para determinar un nivel umbral que se puede emplear para categorizar las células con un nivel bajo o alto de expresión del Biomarcador X.

En algunos casos, el umbral de un biomarcador se determina haciendo una comparación de los niveles de un biomarcador dentro de una población de células, p. ej., una población de células de niveles desconocidos de Biomarcador X o una población de células que se sospecha que contiene subpoblaciones que tienen diferentes niveles de Biomarcador X. Por ejemplo, el nivel de Biomarcador X se mide en un citómetro de flujo de al menos un número suficiente de células de modo que las mediciones se puedan trazar, p. ej., en un histograma, y la separación entre dos o más subpoblaciones de células se revela en función de los niveles del Biomarcador X de células individuales. En consecuencia, el operador del citómetro de flujo puede determinar un nivel umbral entre las subpoblaciones que se puede utilizar para categorizar las células como pertenecientes a una subpoblación particular, p. ej., una subpoblación que tiene un nivel bajo de Biomarcador X o una subpoblación que tiene un nivel alto de biomarcador X.

En algunos casos, el umbral del biomarcador se basa en el límite de detección del citómetro de flujo. Por ejemplo, las células de una población de células se pueden identificar por tener un biomarcador particular (es decir, ser positivas

para un biomarcador particular) si las células tienen algún nivel detectable de un biomarcador particular. Asimismo, se puede identificar que las células de una población de células no tienen un biomarcador particular (es decir, que son negativas para un biomarcador particular) si las células no tienen un nivel detectable de un biomarcador particular. En consecuencia, el nivel de detección del citómetro de flujo se puede utilizar para determinar el umbral del biomarcador.

5 En algunos casos, el umbral del biomarcador se basa en niveles de biomarcadores previamente determinados (es decir, niveles de biomarcadores de referencia), p. ej., de experimentos de control realizados previamente o niveles de referencia adquiridos previamente. Por ejemplo, los niveles de biomarcador determinados en muestras de pacientes previamente analizadas, p. ej., de pacientes con TB y pacientes sanos, pacientes con LTBI, pacientes con ATB, etc., se pueden utilizar para determinar los niveles umbral de biomarcadores. En algunos casos, los niveles de biomarcadores esperados de las células obtenidas de sujetos sanos se pueden utilizar para determinar los niveles normales de biomarcadores, de modo que se puede determinar un umbral de biomarcador que sea representativo del rango normal de biomarcador. En tales casos, se considera que los niveles de biomarcador fuera, es decir, por encima o por debajo del rango normal de biomarcador, están por encima o por debajo del umbral de biomarcador particular. En algunos casos, el uso de tales niveles de biomarcadores previamente determinados o niveles de umbral previamente determinados permite el análisis de células y la identificación de subpoblaciones celulares en ausencia de una muestra celular de control o de referencia.

20 En ciertas realizaciones, se realiza una evaluación basada en una firma de biomarcador que incluye biomarcadores además de los biomarcadores específicamente descritos en el presente documento. En ciertos casos, tales biomarcadores adicionales pueden denominarse "biomarcadores del anfitrión que no son de TB" o simplemente "biomarcadores adicionales". Cualquier biomarcador del anfitrión que no sea de TB o biomarcador adicional útil conveniente para hacer una evaluación de un sujeto que se sospecha que tiene TB o que se sabe que tiene TB, incluyendo, p. ej., los biomarcadores utilizados para evaluar la salud general o una afección o enfermedad no relacionada con la TB puede resultar útil en las evaluaciones descritas en el presente documento.

25 En ciertas realizaciones en las que se realiza una evaluación basada en una firma de biomarcador de TB que incluye biomarcadores además de los biomarcadores de TB del anfitrión como se describe en el presente documento, tales biomarcadores adicionales pueden incluir cambios en la expresión génica, p. ej., cambios en la expresión génica dentro de las células anfítrionas, p. ej., células sanguíneas del anfitrión, identificados analizando la cantidad relativa de ARNm para genes particulares en células obtenidas de diferentes grupos de tratamiento o grupos de pacientes. Por ejemplo, los genes que se expresan diferencialmente en pacientes con TB pulmonar analizados en varios puntos del tratamiento, p. ej., en el diagnóstico y durante el tratamiento, incluyendo, pero sin limitarse a, los descritos por Cliff et al. (2013) *J. Infect. Dis.* 207(1):18-29.

30 En algunos casos, ciertos biomarcadores tienen características que justifican su exclusión de una firma de biomarcador o evaluación de TB en particular. Las características de los biomarcadores que pueden justificar la exclusión de la firma de un biomarcador incluyen, pero no se limitan a, p. ej., alta expresión en el momento inicial del biomarcador, baja expresión en el momento inicial del biomarcador, expresión variable del biomarcador en muestras de control, etc. Por ejemplo, en algunos casos, los biomarcadores útiles para determinar una firma de biomarcador para hacer un seguimiento de la progresión del tratamiento contra TB en un paciente durante el tratamiento contra la TB excluyen específicamente los biomarcadores de TB del anfitrión que se expresan en niveles altos. Por ejemplo, en algunos casos, los biomarcadores que muestran una diferencia estadísticamente significativa entre dos grupos de tratamiento se pueden excluir de una firma de biomarcador utilizada para realizar una evaluación de TB, p. ej., porque tal diferencia no es biológicamente significativa. Los biomarcadores de TB del anfitrión que se expresan en niveles altos pueden variar y, en algunos casos, incluyen, pero no se limitan a, aquellos marcadores que están presentes en 85% a 100% de la población de células medida, incluyendo, p. ej., 86% a 100%, 87% a 100%, 88% a 100%, 89% a 100%, 90% a 100%, 91% a 100%, 92% a 100%, 93% a 100%, de 94% a 100%, 95% a 100%, 96% a 100%, 97% a 100%, 98% a 100%, 99% a 100%, 85% a 99%, 90% a 99% y 95% a 99%.

45 El análisis de una muestra activada con TB, p. ej., como se describe anteriormente, da como resultado la producción de la firma del biomarcador de TB. Como se revisó anteriormente, la firma del biomarcador de TB se compone de datos de biomarcadores para dos biomarcadores más, es decir, una pluralidad de biomarcadores. En los casos descritos, que no forman parte de la invención, la firma del biomarcador de TB se compone de al menos uno de los datos de CD154 y los datos del fenotipo CM, p. ej., datos de fenotipo CM1/CM2/CM3, p. ej., datos de CD45RA, CD197 (CCR7), CD27, CD28. En realizaciones, la firma del biomarcador de TB se compone de datos de CD154, CD45RA, CD197 (CCR7), CD27, CD28. Una firma de biomarcador de TB determinada puede incluir datos para uno o más marcadores adicionales, tales como los descritos específicamente anteriormente, incluyendo datos de identificación de células T, p. ej., datos de CD3, CD4 y/o CD8, etc. En la invención, una firma de biomarcador de TB se compone de datos de CD154 y datos de fenotipo CM como se define en las reivindicaciones.

Obtención de una evaluación de TB a partir de una firma de biomarcador de TB

50 La divulgación en cuestión describe evaluaciones y/o mediciones de biomarcadores que se utilizan para producir una firma de biomarcador, cuya firma se puede utilizar para realizar una evaluación de TB. El uso de las evaluaciones y/o mediciones de biomarcadores y las firmas de biomarcadores producidas para realizar las evaluaciones de TB variará según se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, las evaluaciones de TB de sujetos, p. ej., para

su uso en el diagnóstico de TB o en el seguimiento clínico de la TB en un sujeto, se realizan detectando los niveles de biomarcadores del anfitrión, p. ej., biomarcadores del anfitrión que incluyen biomarcadores de TB presentes sobre la superficie de las células, obtenidas del sujeto. Por ejemplo, el nivel de un biomarcador del anfitrión utilizado para realizar una evaluación de un sujeto se puede medir y comparar con un umbral de biomarcador particular, p. ej., para determinar si el biomarcador está presente por encima de un nivel umbral particular o por debajo de un nivel umbral particular. En ciertos casos, se determina el número o la proporción de células de una muestra que tiene un nivel de biomarcador por encima o por debajo de un nivel umbral de biomarcador en particular, p. ej., para identificar una subpoblación o múltiples subpoblaciones en particular o para producir una firma de biomarcador, y se utiliza para realizar la evaluación.

10 El uso de firmas de biomarcadores para realizar evaluaciones de TB variará y puede depender del sujeto en particular o de la población de pacientes y el propósito de la evaluación de TB en particular. Las firmas de biomarcadores se pueden comparar con las firmas de biomarcadores de referencia para guiar el diagnóstico o el tratamiento o el seguimiento del tratamiento o el seguimiento de la progresión de la enfermedad y los aspectos particulares de la evaluación de la TB pueden depender del historial médico o las circunstancias del tratamiento del sujeto en particular.

15 *Tratamiento*

En ciertos casos, las evaluaciones de la TB tal como se describen en el presente documento pueden utilizarse para el seguimiento del tratamiento de la TB, p. ej., el tratamiento de la TB de sujetos con infección por TB latente o sujetos con la enfermedad de TB. Los tratamientos de la TB varían, como se describe a continuación, y durante los mismos se puede realizar un seguimiento con una frecuencia regular o variable y, en algunos casos, pueden incluir la ingestión de uno o más medicamentos efectivos contra la TB durante un período de tiempo, p. ej., oscilando de un mes a muchos años, incluyendo, pero sin limitarse a, p. ej., de 1 a 12 meses, de 2 a 12 meses, de 3 a 12 meses, de 4 a 12 meses, de 5 a 12 meses, de 6 a 12 meses, de 1 a 9 meses, de 2 a 9 meses, de 3 a 9 meses, de 4 a 9 meses, de 5 a 9 meses, de 6 a 9 meses, de 9 meses a 12 meses, de 1 año a 2 años, de 1 año a 3 años, etc. En algunos casos, se realizan una o más evaluaciones de TB en o cerca del final planificado del tratamiento, incluyendo, pero sin limitarse a, el último día planificado de tratamiento o en el plazo de 1 día a 1 mes del último día planificado de tratamiento, incluyendo, p. ej., en el plazo de 1 a 2 días, en el plazo de 2 a 3 días, en el plazo de 3 a 5 días, en el plazo de una semana, en el plazo de 2 semanas, en el plazo de 3 semanas, en el plazo de un mes, etc., para determinar si el tratamiento debe interrumpirse según lo planeado. Por ejemplo, en algunos casos, una evaluación de la TB realizada al final del tratamiento planificado o cerca de este (es decir, una evaluación al final del tratamiento) puede indicar que el tratamiento no debe interrumpirse según lo planificado, p. ej., la evaluación de la TB puede indicar, p. ej., un estado de infección de TB o enfermedad de TB más alto de lo anticipado, de modo que un profesional médico determine que se debe continuar con el tratamiento. En otros casos, p. ej., una evaluación al final del tratamiento puede indicar que el tratamiento debe interrumpirse antes de lo planificado, p. ej., la evaluación de TB puede indicar, p. ej., un estado de infección de TB o enfermedad de TB inferior al anticipado, de modo que un profesional médico determine que el tratamiento debe suspenderse.

Se pueden emplear evaluaciones de TB para determinar regímenes de tratamiento para un sujeto y, cuando se desee, los aspectos de los métodos, aunque no formen parte de la invención, pueden incluir adicionalmente la administración del régimen de tratamiento determinado al sujeto. En ciertos casos, las personas con infección de TB latente pueden permanecer sin tratamiento y se puede realizar el seguimiento de la infección de TB utilizando las evaluaciones descritas en el presente documento, p. ej., se puede realizar el seguimiento de un sujeto infectado con TB no tratado para detectar o predecir el desarrollo de la enfermedad de TB. En otros casos, las personas con infección de TB latente pueden recibir tratamiento, p. ej., para prevenir el desarrollo de la enfermedad de TB, y se puede realizar el seguimiento de la infección de TB utilizando las evaluaciones descritas en el presente documento, p. ej., se puede realizar el seguimiento de un sujeto infectado con TB que se somete a tratamiento para detectar o predecir el desarrollo de la enfermedad de TB. Cuando se utiliza para realizar el seguimiento, p. ej., realizar el seguimiento de la infección de TB o la enfermedad de TB, la frecuencia de las evaluaciones de TB puede variar y puede oscilar, p. ej., de frecuencias diarias a anuales, incluyendo, pero sin limitarse a, diarias, en días alternos, cada dos días, dos veces a la semana, semanalmente, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, mensual, una vez cada dos meses, trimestralmente, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, una vez cada seis meses, una vez cada siete meses, una vez cada ocho meses, una vez cada nueve meses, una vez cada diez meses, una vez cada once meses, anualmente, etc. En algunos casos, la frecuencia del seguimiento se puede basar en el riesgo de los sujetos de desarrollar la enfermedad de TB, p. ej., los sujetos con mayor riesgo de desarrollar la enfermedad de TB, p. ej., los sujetos inmunocomprometidos, pueden someterse al seguimiento con alta frecuencia de evaluación y los sujetos con función inmunológica normal, p. ej. o, los sujetos no inmunodeprimidos, pueden someterse al seguimiento con una baja frecuencia de evaluación.

Los tratamientos actuales contra la TB varían y los médicos eligen regímenes de tratamiento de TB particulares dependiendo de una serie de factores clínicos que incluyen, pero no se limitan a, p. ej., características del sujeto particular que se somete a terapia, características de la TB particular que se está tratando, p. ej., enfermedad de TB, TB latente, TB resistente a los fármacos, etc. Por ejemplo, los tratamientos actuales sugeridos por el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) para la TB latente y la enfermedad de TB incluyen los descritos en la Tabla 1 y la Tabla 2 a continuación:

Tabla 1. Regímenes de tratamiento de la infección de tuberculosis latente

Fármacos	Duración	Intervalo	Dosis mínimas
Isoniazida	9 meses	A diario	270
		Dos veces a la semana*	76
Isoniazida	6 meses	A diario	180
		Dos veces a la semana*	52
Isoniazida y Rifapentina	3 meses	Una vez a la semana*	12
Rifampina	4 meses	A diario	120

*Utilizar la Terapia de Observación Directa (DOT)

Tabla 2. Regímenes básicos de tratamiento de la enfermedad de TB

Régimen Preferido	Régimen alternativo	Régimen alternativo
Fase inicial	Fase inicial	Fase inicial
INH, RIF, PZA y EMB* diarios durante 56 dosis (8 semanas)	INH, RIF, PZA y EMB* diarios por 14 dosis (2 semanas), después dos veces por semana durante 12 dosis (6 semanas)	INH, RIF, PZA y EMB* tres veces por semana durante 24 dosis (8 semanas)
Fase de continuación	Fase de continuación	Fase de continuación
INH y RIF diarios durante 126 dosis (18 semanas)	INH y RIF dos veces por semana durante 36 dosis (18 semanas)	INH y RIF tres veces por semana durante 54 dosis (18 semanas)
O		
INH y RIF dos veces por semana durante 36 dosis (18 semanas)		

Abreviaturas: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA), etambutol (EMB).

*EMB puede suspenderse si los estudios de susceptibilidad a los fármacos demuestran susceptibilidad a los fármacos de primera línea. **Nota:** Se puede utilizar una fase de continuación de INH/rifapentina una vez por semana para pacientes negativos para VIH que no tienen cavidades en la radiografía de tórax, y que tienen frotis negativos para bacilos acidorresistentes (BAAR) al finalizar la fase inicial del tratamiento.

- 5 En ciertos casos, los métodos pueden incluir una determinación de que un tratamiento agresivo contra la tuberculosis está indicado para un sujeto. Un tratamiento agresivo contra la tuberculosis puede incluir la administración de una combinación de más de dos agentes antibacterianos, opcionalmente combinados con un corticosteroide tal como la dexametasona. En ciertos casos, el tratamiento agresivo de la tuberculosis puede incluir la administración de una combinación de isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol. En ciertos casos, un tratamiento agresivo contra la tuberculosis puede incluir la administración de meropenemo y ácido clavulánico combinados con uno o más agentes antibióticos adicionales.
- 10 En algunos casos, los métodos pueden incluir la determinación de que un tratamiento menos agresivo contra la tuberculosis está indicado para un sujeto. En ciertas realizaciones, el tratamiento menos agresivo contra la tuberculosis es solo uno o no más de una combinación de dos agentes antibacterianos. En ciertas realizaciones, el tratamiento menos agresivo contra la tuberculosis es una combinación de solo isoniazida y rifampicina. En ciertas realizaciones,
- 15

la medición, cuantificación o indicación se registran en un medio legible por ordenador. En ciertas realizaciones, la medida, cuantificación o indicación se comunican a un profesional médico o al sujeto.

Los términos agente "antibacteriano" o "antibiótico" se refieren a moléculas que pueden destruir o inhibir el crecimiento de bacterias. En ciertos casos, el antibiótico se selecciona del grupo que comprende sulfonamidas, diaminopirimidinas,

5 quinolonas, antibióticos betalactámicos, cefalosporinas, tetraciclinas, derivados de nitrobenceno, aminoglucósidos, antibióticos macrólidos, antibióticos polipeptídicos, derivados de nitrofurano, nitroimidazoles, derivados del ácido nicotínico, antibióticos de polieno, derivados de imidazol o glicopéptido, lipopéptidos cílicos, glicilciclinas y oxazolidinonas. En otros casos, estos antibióticos incluyen, pero no se limitan a, sulfadiazina, sulfonas - [dapsona (DDS) y paraaminosalicílico (PAS)], sulfanilamida, sulfametoxazol, sulfapiridina, trimetoprima, pirimetamina, ácidos nalidíxicos, norfloxacina, ciprofloxacina, cinoxacina, enoxacina, gatifloxacina, gemifloxacina, grepafloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, ofloxacina, pefloxacina, esparfloxacina, trovafloxacina, penicilinas (amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, hetacilina, oxacilina, mezlocillina, penicilina G, penicilina V, piperacilina), cefalosporinas (cefacetilo, cefadroxilo, cefalexina, cefaloglicina, cefalonio, cefaloridina, cefalotina, cefapirina, cefatrizina, cefazaflur, cefazedona, cefazolina, cefradina, cefroxadina, ceftezol, cefaclor, cefonidic, ceforanida, cefprozil, cefuroxima, cefuzonam, cefinetazol, cefoteta, cefoxitina, cefcapeno, cefdaloxima, cefdinir, cefditoren, cefetamet, cefixima, cefmenoxima, cefodizima, cefoperazona, cefotaxima, cefotiam, cefpimizol, cefpiramida, cefpodoxima, cefteram, ceftributen, ceftiofur, ceftiolen, ceftizoxima, ceftriaxona, cefoperazona, ceftazidima, cefepima), moxolactama, carbapenemos (imipenem, ertapenem, meropenem) monobactamass (aztreonam) oxitetraciclina, clortetraciclina, clomociclina, demeclociclina, tetraciclina, doxiciclina, 20 limeciclina, mecloclicina, metaciclina, minociclina, rolitetraciclina, cloranfenicol, amikacina, gentamicina, framicetina, kanamicina, neomicina, neomicina, netilmicina, estreptomicina, tobramicina, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, telitromicina, polimixina-B, colistina, bacitracina, tirotricina, notrifurantoína, furazolidona, metronidazol, imidazol, isoniazida, pirazinamida, etionamida, nistatina, anfotericina-B, hamicina, miconazol, clotrimazol, cetoconazol, fluconazol, rifampacina, lincomicina, clindamicina, espectinomicina, cloranfenicol, 25 clindamicina, colistina, fosfomicina, loracarbef, metronidazol, nitrofurantoína, polimixina B, sulfato de polimixina B, procaína, espectinomicina, tinidazol, trimetoprima, ramoplanina, teicoplanina, vancomicina, trimetoprima, sulfametoxazol, nitrofurantoína, profármacos o sales alternativas de los mismos. En ciertos casos, el tratamiento agresivo comprende liposomas que incluyen agentes seleccionados entre fosfatidilcolina (PC), ácido L-a fosfatídico (PA) y colesterol que contiene 4-(5-pentadecil-1,3,4-oxadiazol-2-il)piridina.

30 En algunos casos, el tratamiento contra la TB puede incluir una fase de continuación. En ciertos casos, la fase de continuación del tratamiento se administra durante un período de tiempo después de una fase inicial de tratamiento, p. ej., durante 4 o 7 meses. La duración de la fase de continuación puede variar y puede depender de las características particulares del paciente. Por ejemplo, se recomienda una fase de continuación de 7 meses para grupos de pacientes particulares, incluyendo, p. ej., pacientes con tuberculosis pulmonar cavitaria causada por organismos sensibles a los fármacos y cuyo cultivo de esputo obtenido al finalizar los 2 meses de tratamiento es positivo; pacientes cuya fase inicial de tratamiento no incluía PZA; y pacientes en tratamiento con INH y rifapentina una vez a la semana y cuyo cultivo de esputo obtenido en el momento de la finalización de la fase inicial es positivo. En ciertas realizaciones, el seguimiento del tratamiento mediante el uso de las evaluaciones de TB descritas en el presente documento se puede realizar durante dicha fase de continuación. En otros casos, el seguimiento del tratamiento mediante el uso de las evaluaciones de TB descritas en el presente documento se puede detener antes o durante una fase de continuación.

40 El final del tratamiento contra la TB se determina comúnmente por la finalización de un régimen de tratamiento particular, p. ej., un régimen de fármacos particular que incluye, p. ej., una cantidad de dosis de fármacos ingeridas durante un período de tiempo determinado. En ciertos casos, los regímenes de tratamiento contra la TB, incluyendo el final determinado del tratamiento contra la TB, se modifican de acuerdo con las características particulares del paciente, que incluyen, p. ej., infección por VIH, resistencia a los fármacos, embarazo, edad del paciente, etc. En ciertos casos, el final del tratamiento contra la TB se puede ser determinar basándose en las evaluaciones de la TB descritas en el presente documento junto con el final de un régimen de tratamiento particular, p. ej., el final del tratamiento contra la TB determinado por un régimen de tratamiento particular se puede modificar en función de los resultados de una evaluación de TB particular. En ciertos casos, el final del tratamiento contra la TB se puede determinar basándose en una evaluación de la TB descrita en el presente documento independientemente de cualquier régimen de tratamiento en particular, p. ej., el final del tratamiento contra la TB se puede determinar esencialmente por medio de una o más evaluaciones de la TB como se describe en el presente documento. En algunos casos, tales evaluaciones de la TB útiles para determinar y/o confirmar el final del tratamiento contra la TB incluyen, pero no se limitan a, las evaluaciones descritas en el presente documento, evaluaciones de fin de tratamiento y evaluaciones posteriores al tratamiento.

50 En algunos casos, el seguimiento del tratamiento contra la TB incluye una o más evaluaciones posteriores al tratamiento o evaluaciones de seguimiento que se realizan después de que se suspenda el tratamiento, p. ej., para detectar una recaída de la enfermedad de TB o la infección de TB. El momento y la frecuencia de las evaluaciones de seguimiento variarán y dependerán de las características de la infección de TB (p. ej., si el paciente tiene una infección latente o enfermedad de TB), las características del régimen de tratamiento (p. ej., la duración del tratamiento), las características del historial médico del sujeto (p. ej., si el sujeto tiene o ha tenido otras enfermedades o tratamientos pulmonares), el riesgo relativo de recaída del sujeto (p. ej., si el sujeto está inmunocomprometido, tiene un mayor riesgo de volverse inmunocomprometido o no está inmunocomprometido), y otras consideraciones (p. ej., la

disponibilidad del sujeto para más pruebas de seguimiento, la edad del sujeto, las consideraciones de calidad de vida, etc.). En algunos casos, se pueden realizar una o más evaluaciones de seguimiento en un período posterior al último tratamiento que varía de días a años, incluyendo, pero sin limitarse a, p. ej., de 2 días a 10 años, de 2 días a 5 años, de 2 días a 2 años, de 2 días a 1 año, de 2 días a 9 meses, de 2 días a 6 meses, de 2 días a 3 meses, de 2 días a 2 meses, de 2 días a 1 mes, de 2 días a 3 semanas, de 2 días a 2 semanas, de 2 días a 1 semana, de 1 a 2 semanas, de 1 a 3 semanas, de 1 semana a 1 mes, de 1 semana a 2 meses, de 1 a 6 meses, de 1 a 5 meses, de 1 a 4 meses, de 1 a 2 años, de 1 a 3 años, de 1 a 4 años, de 1 a 5 años, de 1 a 6 años, de 1 a 7 años, de 1 a 8 años, de 1 a 9 años, de 1 a 10 años, etc. Como se discutió anteriormente, la frecuencia de las evaluaciones de seguimiento puede variar y en algunos casos puede oscilar, p. ej., de frecuencias diarias a anuales, incluyendo, pero sin limitarse a, a diario, en días alternos, cada dos días, dos veces por semana, semanalmente, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, mensualmente, una vez cada dos meses, trimestralmente, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, una vez cada seis meses, una vez cada siete meses, una vez cada ocho meses, una vez cada nueve meses, una vez cada diez meses, una vez cada once meses, anualmente, etc. En algunos casos, las evaluaciones de seguimiento se realizan indefinidamente, p. ej., durante el resto de la vida del sujeto, y la necesidad de tal seguimiento indefinido puede depender de varios factores clínicos y puede ser necesaria, p. ej., debido a la disminución de la función inmunitaria, p. ej., debido al deterioro del sistema inmunológico relacionado con la edad.

La presente divulgación proporciona métodos para realizar evaluaciones de TB de sujetos, tales como el diagnóstico y el seguimiento clínico de la TB en un sujeto, mediante la detección de los niveles de uno o más biomarcadores, incluyendo, p. ej., biomarcadores de TB, p. ej., biomarcadores de TB del anfitrión presentes sobre la superficie de células obtenidas del sujeto.

En algunos casos, un sujeto que necesita una evaluación de TB puede ser un mamífero, p. ej., un ser humano, del que se sospecha que se ha infectado recientemente con la bacteria de la TB, p. ej., después de una exposición a la TB, p. ej., asociación o contacto con una persona o un animal infectados con TB. o después del contacto con materiales que se sospecha o se sabe que contienen la bacteria de la TB, incluyendo, p. ej., muestras de pacientes con TB o materiales que se sabe que han estado en contacto con un paciente con TB. En algunos casos, una exposición a la TB también puede incluir una asociación indirecta con una persona infectada con TB, lo que incluye, p. ej., ocupar un lugar que se sabe que estuvo ocupado anteriormente por una persona infectada con TB o tener contacto o asociación con una persona que se sabe que ha tenido contacto o asociación con una persona infectada de tuberculosis. En ciertos casos, una infección o exposición puede considerarse reciente cuando la infección o exposición ocurre en el plazo de un período de tiempo de menos de 1 año desde la infección o exposición conocida o sospechada, incluyendo, pero sin limitarse a, p. ej., menos de 6 meses, menos de 5 meses, menos de 4 meses, menos de 3 meses, menos de 2 meses, menos de 1 mes, menos de 3 semanas, menos de 2 semanas, menos de 1 semana, 1 semana, 6 días, 5 días, 4 días, o 3 días.

En algunos casos, un sujeto que necesita una evaluación de TB puede ser una persona que se sospecha o se sabe que tiene una infección de TB latente o una persona que se sospecha o se sabe que tiene la enfermedad de TB. Un sujeto infectado con la bacteria de la TB puede o no desarrollar la enfermedad de TB, es decir, un individuo infectado con TB puede volverse sintomático, desarrollar la enfermedad de TB o permanecer asintomático durante algún tiempo teniendo así una infección de TB latente. En la enfermedad de TB, las bacterias de la TB se activan, ya sea en un individuo recién infectado o en un individuo con una infección de TB latente, cuando el sistema inmunológico del individuo no logra suprimir el crecimiento bacteriano de la TB. La enfermedad de TB se puede definir como una infección de TB en la que las bacterias de la TB se multiplican activamente en el cuerpo del anfitrión. Los sujetos con enfermedad de TB son generalmente sintomáticos e infecciosos.

Una persona que se sospecha o se sabe que tiene una infección de TB latente se puede describir en el presente documento como un paciente con TB latente o un sujeto infectado con TB latente. Un paciente con TB latente puede tener una infección de TB latente durante cualquier período de tiempo y el desarrollo de la enfermedad de TB a partir de TB latente depende de la presencia o ausencia de varios factores de riesgo. Muchas personas con infección de TB latente nunca desarrollan la enfermedad de TB. Algunas personas desarrollan la enfermedad de TB en el plazo de las semanas posteriores a la infección y otras desarrollan la enfermedad de TB años después de la infección latente, p. ej., después de quedar inmunocomprometidos, p. ej., por una infección secundaria, p. ej., por una infección secundaria por VIH. En las personas inmunodeprimidas, el riesgo de desarrollar la enfermedad de TB es mucho mayor que en las personas no inmunocomprometidas, es decir, aquellas con sistemas inmunológicos normales. Como tal, en algunos casos, un sujeto que necesita una evaluación de TB puede ser un sujeto que recientemente ha tenido un evento de compromiso inmunológico, p. ej., una infección reciente con un agente que compromete el sistema inmunológico, incluyendo, p. ej., agentes que causan enfermedades que comprometen el sistema inmunológico, p. ej., VIH, o recientemente se ha descubierto que está infectado con un agente que compromete el sistema inmunológico.

Basándose en la presencia o ausencia acumulada de factores de riesgo particulares, un sujeto puede tener un riesgo alto, normal o bajo de desarrollar la enfermedad de TB. Los factores de riesgo que aumentan las posibilidades de que un sujeto desarrolle la enfermedad de TB, es decir, los factores de riesgo que indicarían un alto riesgo, incluyen, pero no se limitan a, una infección reciente con la bacteria de la TB, sistemas inmunológicos débiles relacionados con la edad (p. ej., bebés, niños pequeños y personas mayores), otras afecciones médicas que debilitan el sistema inmunológico (p. ej., infección por VIH, abuso de sustancias, silicosis, diabetes mellitus, enfermedad renal grave, bajo peso corporal, trasplantes de órganos, cáncer de cabeza y cuello, etc.), tratamiento médico concomitante que debilita

el sistema inmunológico (p. ej., fármacos inmunosupresores, corticosteroides, fármacos antirrechazo después de un trasplante de órganos, radioterapia, quimioterapia, tratamientos para la artritis reumatoide, tratamientos para la enfermedad de Crohn, etc.).

5 En algunos casos, los sujetos en los que se realiza una evaluación de TB pueden tener o no otras enfermedades pulmonares, p. ej., otra enfermedad pulmonar además de TB u otra enfermedad pulmonar en lugar de TB, p. ej., otra enfermedad pulmonar que puede confundirse con TB. Tales otras enfermedades pulmonares incluyen, pero no se limitan a: bronquitis aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), asbestosis, asma, bronquiectasias, bronquiolitis, bronquiolitis obliterante con neumonía organizada (BONO), displasia broncopulmonar, bisinosis, bronquitis crónica, coccidioidomicosis (Cocci), EPOC, neumonía en organización criptogénica (NOC), fibrosis quística, enfisema, síndrome pulmonar por Hantavirus, histoplasmosis, Metapneumovirus humano, neumonitis por hipersensibilidad, influenza, cáncer de pulmón, linfangiomatosis, mesotelioma, síndrome respiratorio del Medio Oriente, micobacterias no tuberculosas, tos ferina, neumoconiosis (enfermedad de pulmón negro), neumonía, discinesia ciliar primaria, hipertensión pulmonar primaria, hipertensión arterial pulmonar, fibrosis pulmonar, enfermedad vascular pulmonar, virus respiratorio sincitial, sarcoidosis, síndrome respiratorio agudo severo, silicosis, 10 apnea del sueño y similares.

15

Evaluaciones adicionales de TB

20 En ciertas realizaciones, una evaluación de TB que incluye la producción o el análisis de una firma de biomarcador también incluye evaluaciones o pruebas adicionales, de modo que la producción o el análisis de la firma de biomarcador de TB es un componente de un protocolo de evaluación más extenso, cuyo protocolo de evaluación extenso puede incluir, p. ej., una pluralidad de pruebas. En algunos casos, una evaluación de TB puede incluir la producción o el análisis de una firma de biomarcador de TB antes, al mismo tiempo o después de una o más evaluaciones o pruebas clínicas adicionales. Por ejemplo, una evaluación de TB que incluye la producción o el análisis de una firma de biomarcador de TB se puede realizar después de una evaluación clínica convencional, incluyendo, pero sin limitarse, un examen físico convencional, un análisis de sangre convencional, una prueba de función pulmonar convencional, una prueba de TB convencional, etc. En otros casos, una evaluación de TB consiste esencialmente, si no solo en, la producción o el análisis de una o más firmas de biomarcadores de TB.

25

30 Las evaluaciones o pruebas clínicas adicionales, también denominadas en el presente documento "otras pruebas clínicas" que pueden contribuir a una evaluación de TB, pueden variar e incluir, sin limitarse a, aquellas pruebas que se sabe que son útiles para evaluar la infección por TB, la enfermedad de TB, otras enfermedades pulmonares (p. ej., las descritas en el presente documento), o la función pulmonar general. Por ejemplo, en algunos casos, una evaluación incluye una o más pruebas de función pulmonar, incluyendo, pero sin limitarse a: Capacidad Vital Forzada (CVF), CVF%p, Volumen Espiratorio Forzado en 1 Segundo (VEF1), VEF1% (VEF1/CVF), Flujo Espiratorio Máximo (FEP), Flujo Espiratorio Forzado 25-75% o 25-50% (FEF 25-75% o 25-50%), Flujo Inspiratorio Forzado 25%-75% o 25%-50% (FIF 25-75% o 25-50%), Tiempo de Espiración Forzada (TEF), Volumen Tidal (VT), Ventilación Voluntaria Máxima (VVM), Capacidad Residual Funcional (CRF), Capacidad de Difusión de Monóxido de Carbono Pulmonar (DLCO), y similares. Otras pruebas clínicas que se pueden utilizar como parte o como combinación con una evaluación de TB como se describe en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, tomografía computarizada (TC), tomografía por emisión de positrones (PET), exploración combinada PET-CT, obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM), frotis de esputo, cultivo, pruebas genéticas, pruebas proteómicas, etc. Por ejemplo, en algunos casos, una evaluación de TB puede incluir una o más TC, PET, PET/TC combinadas o exploración IRM y el análisis de tales exploraciones, p. ej., como describen Skoura et al., Int J Infect Dis. 2015, 32:87-93; Vorster et al., Mol Imaging Radionucl Ther. 2015, 5;24(1):42; Coleman et al., Sci Transl Med. 2014, 6(265):265ra167; Chen et al., Sci Transl Med. 3 de diciembre de 2014; 6(265): 265ra166 y Vorster et al., Curr Opin Pulm Med. 2014, 20(3):287-93.

35

40 En ciertas realizaciones, al realizar una evaluación de TB, se pueden realizar una o más pruebas de TB convencionales además de las evaluaciones de TB descritas en el presente documento, p. ej., para confirmar o refutar un resultado de una prueba de TB convencional anterior. Las pruebas de TB convencionales incluyen, p. ej., pruebas de detección de TB. En ciertos casos, las pruebas de TB convencionales se pueden utilizar como un componente de una evaluación integral de TB, p. ej., se utilizan junto con una evaluación que incluye la determinación de una firma de biomarcador como se describe en el presente documento, que puede conducir a una evaluación del tratamiento de TB o un diagnóstico de TB. Las pruebas de TB convencionales se pueden utilizar para detectar la TB latente y la enfermedad de TB. Se puede emplear cualquier método de prueba de TB conveniente, incluyendo, pero sin limitarse a, la prueba cutánea de TB (TST, por sus siglas en inglés), pruebas sanguíneas de TB, etc. Las pruebas de TB convencionales generalmente las realiza un profesional de la salud o el departamento de salud local y se pueden considerar pruebas de escrutinio. Las reacciones positivas a las pruebas de TB convencionales generalmente indican la necesidad de más pruebas, p. ej., para confirmar la infección de TB o para determinar si el sujeto tiene la enfermedad de TB. En algunos casos, las pruebas adicionales indicadas por una reacción positiva a una prueba de TB convencional se realizan utilizando las evaluaciones de TB descritas en el presente documento.

45

50 En ciertas realizaciones, una evaluación de TB puede incluir una determinación, evaluación o medición de biomarcadores además de los biomarcadores específicos descritos en el presente documento. Tales biomarcadores adicionales incluyen aquellos biomarcadores además de los descritos en el presente documento que se pueden utilizar para diagnosticar TB, evaluar el estado de enfermedad de TB, hacer un seguimiento de la progresión de la enfermedad

55

60

de TB, evaluar la eficacia del tratamiento contra la TB o evaluar la salud general.

En algunos casos, se pueden realizar evaluaciones de TB que incluyen el seguimiento clínico, incluyendo, p. ej., evaluaciones de fin de tratamiento y evaluaciones de seguimiento, para detectar la aparición de infección por TB resistente a un fármaco o resistente a múltiples fármacos, p. ej., para indicar la necesidad de inicio de un régimen de tratamiento de TB resistente a los fármacos. La TB resistente a los fármacos está causada por bacterias de TB que son resistentes al menos a un fármaco anti-TB de primera línea. La TB resistente a múltiples fármacos (TB RMF) es resistente a más de un fármaco anti-TB, incluyendo, p. ej., al menos isoniazida (INH) y la rifampicina (RIF). En algunos casos, la confirmación de la TB resistente a un fármaco y resistente a múltiples fármacos se realiza mediante pruebas de susceptibilidad a los fármacos. En algunos casos, las evaluaciones de la TB que incluyen el seguimiento del tratamiento contra la TB, p. ej., utilizando las evaluaciones de la TB descritas en el presente documento, se pueden utilizar para detectar la TB resistente a un fármaco o resistente a múltiples fármacos antes o al mismo tiempo que las pruebas de susceptibilidad a los fármacos.

COMPOSICIONES

La presente divulgación proporciona composiciones útiles en la práctica de los métodos divulgados en el presente documento para realizar evaluaciones de TB de sujetos, tales como el diagnóstico y el seguimiento clínico de la TB en un sujeto mediante la detección de los niveles de biomarcadores de TB del anfitrión presentes sobre la superficie de las células obtenidas del sujeto. En algunos casos, las composiciones de la presente divulgación incluyen composiciones de evaluación, que incluyen, p. ej., composiciones de seguimiento de TB y composiciones de diagnóstico de TB.

Tales composiciones pueden incluir uno o más reactivos de detección que detectan los biomarcadores de TB del anfitrión mencionados anteriormente y, en algunos casos, tales reactivos de detección pueden denominarse en el presente documento miembros de unión o miembros de unión de biomarcadores de TB del anfitrión. Tales miembros de unión pueden contener un dominio de marca que puede ser detectado por un dispositivo, p. ej., un citómetro de flujo, lo que permite la identificación cualitativa o la cuantificación del nivel del biomarcador de TB del anfitrión presente en un evento particular detectado por el dispositivo, p. ej., una célula detectada por un citómetro de flujo. En algunos casos, tales miembros de unión pueden contener un dominio de unión de la marca, de modo que el miembro de unión se puede marcar de manera detectable al poner en contacto una solución que contiene el miembro de unión con una marca detectable que se une al dominio de unión de la marca, p. ej., poniendo en contacto una solución que contiene el miembro de unión con un anticuerpo secundario que está marcado de forma detectable. Se puede utilizar cualquier marca detectable para marcar directa o indirectamente de manera detectable un miembro de unión de la presente divulgación, incluyendo las conocidas en la técnica y las descritas en otras partes del presente documento.

En algunos casos, las composiciones de la presente divulgación pueden incluir dos o más elementos de unión. Tales miembros de unión incluidos en composiciones de dos o más miembros de unión pueden estar marcados de manera detectable de modo que cada clase de miembro de unión, p. ej., cada miembro de unión que se une a un biomarcador particular, es particularmente detectable, es decir, cada evento de detección de biomarcador es reconocible en cuanto al biomarcador unido por un miembro de unión particular. Por ejemplo, en una composición que incluye dos miembros de unión que detectan dos biomarcadores diferentes, los miembros de unión están marcados de manera detectable con marcas que son distinguibles por el dispositivo de detección. En algunos casos, los miembros de unión incluidos en composiciones de dos o más miembros de unión se pueden etiquetar de manera detectable de modo que dos o más miembros de unión comparten esencialmente la misma marca detectable, p. ej., dos o más miembros de unión están marcados de manera detectable con marcas que no pueden ser distinguidas por el dispositivo de detección. También se pueden proporcionar miembros de unión marcados adicionales. Por ejemplo, el dispositivo de reactivos puede incluir tres, cuatro o más miembros de unión distintos. Si bien el número de miembros de unión marcados distintos puede variar, en algunos casos el número varía de dos a veinte, tal como de tres a quince, incluyendo de cuatro a diez. Además, las composiciones pueden incluir una o más marcas detectables adicionales que se unen específicamente a marcadores celulares adicionales, p. ej., marcadores celulares que identifican una característica adicional de una célula, p. ej., una característica distinta de la expresión de un biomarcador asociado a TB particular sobre la superficie de la célula. Las marcas detectables se pueden unir a marcadores celulares directa o indirectamente, es decir, a través de la unión común de un mediador de unión marcado. Los ejemplos de biomarcadores específicos para los que un miembro de unión marcado puede estar presente en una composición determinada incluyen, pero no se limitan a: CD154, CD45RA, CD197(CCR7), CD27, CD28, CD69, IFN- γ , IL-2, TNF- α , Ki-67, HLA-D4, CD-38, CXCR3, CCR6, CD161, CD3, CD4 y/o CD8, p. ej., como se ha descrito anteriormente.

En algunos casos, las composiciones (tales como las descritas anteriormente) se configuran como dispositivos de reactivos. Los dispositivos de reactivos de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente divulgación incluyen un soporte sólido y al menos un primer y un segundo miembros de unión marcados, p. ej., como se ha descrito anteriormente. El soporte sólido incluido en los dispositivos de reactivos de estas realizaciones puede ser cualquier soporte sólido conveniente que sea compatible con la muestra líquida y/o el reactivo o los reactivos o el analito o los analitos en contacto con el dispositivo de reactivos. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser un soporte sólido compatible con líquidos para dispositivos de reactivos configurados para que contengan una muestra líquida. En algunos casos, la muestra líquida puede ser una muestra líquida acuosa y, en estos casos, el soporte sólido puede ser compatible con muestras acuosas. Por "compatible" se entiende que el soporte sólido es sustancialmente inerte

(p. ej., no reacciona significativamente con) el líquido y/o el reactivo o los reactivos o el analito o los analitos en contacto con el soporte sólido.

El soporte sólido se puede configurar como un recipiente, donde el recipiente está configurado para contener un cierto volumen de un fluido (p. ej., gas o líquido). En ciertas realizaciones, el soporte sólido se configura como un recipiente de líquido. Por ejemplo, el recipiente de líquido puede estar configurado para contener un volumen de líquido. El tamaño del recipiente de líquido puede depender del volumen de líquido que vaya a contener el recipiente de líquido. Por ejemplo, el recipiente de líquido se puede configurar para contener un volumen (p. ej., un volumen de un líquido) que oscile entre 0,1 ml y 1000 ml, tal como de 0,1 ml a 900 ml, o de 0,1 ml a 800 ml, o de 0,1 ml a 700 ml o de 0,1 ml a 600 ml o de 0,1 ml a 500 ml o de 0,1 ml a 400 ml o de 0,1 ml a 300 ml o de 0,1 ml a 200 ml o de 0,1 ml a 100 ml o de 0,1 ml a 50 ml, o de 0,1 ml a 25 ml, o de 0,1 ml a 10 ml, o de 0,1 ml a 5 ml, o de 0,1 ml a 1 ml, o de 0,1 ml a 0,5 ml. En ciertos casos, el recipiente de líquido está configurado para contener un volumen (p. ej., un volumen de líquido) que oscila entre 0,1 ml y 200 ml.

La forma del soporte sólido también puede variar y puede depender del uso del dispositivo de reactivos. Por ejemplo, como se describe en el presente documento, el dispositivo de reactivos puede encontrar uso en un ensayo, tal como un ensayo de una muestra líquida (p. ej., una muestra biológica). En estos casos, el soporte sólido se puede configurar en una forma que sea compatible con el ensayo y/o el método u otros dispositivos utilizados para realizar el ensayo. Por ejemplo, el soporte sólido se puede configurar con la forma de un equipo de laboratorio típico utilizado para realizar el ensayo o con una forma que sea compatible con otros dispositivos utilizados para realizar el ensayo. Como se describió anteriormente, el soporte sólido se puede configurar como un recipiente de líquido. En estas realizaciones, el recipiente de líquido puede ser un vial o un tubo de ensayo. En ciertos casos, el recipiente de líquido es un vial. En ciertos casos, el recipiente de líquido es un tubo de ensayo. Como se describió anteriormente, el recipiente de líquido se puede configurar para contener un volumen (p. ej., un volumen de un líquido). En realizaciones donde el recipiente de líquido es un vial o un tubo de ensayo, el recipiente de líquido se puede configurar para contener un volumen (p. ej., un volumen de un líquido) que oscila de 0,1 ml a 1000 ml, tal como de 0,5 ml a 900 ml, o de 0,5 ml a 800 ml, o de 0,5 ml a 700 ml, o de 0,5 ml a 600 ml, o de 0,5 ml a 500 ml, o de 0,5 ml a 400 ml, o de 0,5 ml a 300 ml, o de 0,5 ml a 200 ml, o de 0,5 ml a 100 ml, o de 0,5 ml a 50 ml, o de 0,5 ml a 25 ml, o de 0,5 ml a 10 ml, o de 0,5 ml a 5 ml, o de 1 ml a 5 ml. En ciertos casos, el vial o tubo de ensayo está configurado para contener un volumen (p. ej., un volumen de un líquido) que oscila de 0,5 ml a 5 ml.

En otras realizaciones, el soporte sólido se configura como una placa de múltiples pocillos. En estos casos, el soporte sólido puede incluir una pluralidad de recipientes de líquido (p. ej., pocillos), tales como 2 o más, o 10 o más, o 50 o más, o 75 o más, o 100 o más, o 300 o más, o 500 o más, o 750 o más, o 1000 o más o 1500 o más, o 2000 o más recipientes de líquido (p. ej., pocillos). Los ejemplos de soportes sólidos configurados como placas de múltiples pocillos pueden incluir, por ejemplo, 6, 24, 96, 384 o 1536 recipientes de líquido (p. ej., pocillos). En realizaciones en las que el recipiente de líquido es un pocillo de una placa de múltiples pocillos, se puede configurar un pocillo individual para contener un volumen (p. ej., un volumen de un líquido) que oscila de 0,1 ml a 1000 ml, tal como de 0,1 ml a 900 ml, o de 0,1 ml a 800 ml, o de 0,1 ml a 700 ml, o de 0,1 ml a 600 ml, o de 0,1 ml a 500 ml, o de 0,1 ml a 400 ml, o de 0,1 ml a 300 ml, o de 0,1 ml a 200 ml, o de 0,1 ml a 100 ml, o de 0,1 ml a 50 ml, o de 0,1 ml a 25 ml, o de 0,1 ml a 10 ml, o de 0,1 ml a 5 ml, o de 0,1 ml a 1 ml, o de 0,1 ml a 0,5 ml. En ciertos casos, el vial o tubo de ensayo están configurados para contener un volumen (p. ej., un volumen de un líquido) que oscila de 0,1 ml a 25 ml.

Como se ha descrito anteriormente, las realizaciones del soporte sólido del dispositivo de reactivos pueden ser compatibles con la muestra líquida y/o el reactivo o los reactivos o el analito o los analitos en contacto con el dispositivo de reactivos. Los ejemplos de materiales de soporte sólidos adecuados para los dispositivos de reactivos incluyen, pero no se limitan a, vidrio y plástico. Por ejemplo, el soporte sólido puede estar compuesto de vidrio, tal como, pero sin limitarse a, vidrio de silicato, vidrio de borosilicato, vidrio de borosilicato de sodio (p. ej., PYREXTM), vidrio de cuarzo fundido, vidrio de sílice fundido y similares. Otros ejemplos de materiales de soporte sólido adecuados para los dispositivos de reactivos incluyen plásticos, tales como, pero sin limitarse a, polipropileno, polimetilpenteno, politetrafluoroetileno (PTFE), perfluoroéteres (PFE), etileno propileno fluorado (FEP), perfluoroalcoxi alcanos (PFA), polietilen-tereftalato (PET), polietileno (PE), polieteretercetona (PEEK) y similares.

En algunas realizaciones, como se describe anteriormente, el soporte sólido está configurado como un recipiente, donde el recipiente está configurado para contener un cierto volumen de un fluido (p. ej., gas o líquido, p.ej., un recipiente de líquido). En algunas realizaciones en las que el soporte sólido está configurado como un recipiente de líquido, el recipiente de líquido puede estar sellado. Es decir, el recipiente de líquido puede incluir un sello que impide sustancialmente que el contenido del recipiente de líquido (p. ej., líquido dentro del recipiente de líquido) salga del recipiente de líquido. El sello del recipiente de líquido también puede evitar sustancialmente que otras sustancias entren en el recipiente de líquido. Por ejemplo, el sello puede ser un sello hermético al agua que impida sustancialmente que los líquidos entren o salgan del recipiente, o puede ser un sello hermético al aire que impida sustancialmente que los gases entren o salgan del recipiente. En algunos casos, el sello es un sello extraíble o rompible, de modo que el contenido del recipiente de líquido puede quedar expuesto al entorno circundante cuando así se deseé, p. ej., si se desea retirar una parte del contenido del recipiente de líquido. En algunos casos, el sello está hecho de un material elástico para proporcionar una barrera (p. ej., un sello hermético al agua y/o al aire) para retener una muestra en el recipiente. Los tipos particulares de sellos incluyen, pero no se limitan a, películas, tales como películas de polímero, tapas, etc., según el tipo de recipiente. Los materiales adecuados para el sello incluyen,

por ejemplo, sellos de caucho o polímeros, tales como, pero sin limitarse a, caucho de silicona, caucho natural, caucho de estireno butadieno, copolímeros de etileno-propileno, policloropreno, poliacrilato, polibutadieno, poliuretano, estireno butadieno y similares, y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el sello es un tabique que se puede perforar con una aguja, jeringa o cánula. El sello también puede proporcionar un acceso conveniente a una muestra en el recipiente, así como una barrera protectora que recubre la abertura del recipiente. En algunos casos, el sello es un sello extraíble, tal como una tapa roscada o a presión u otro elemento de sellado adecuado que se puede aplicar a la abertura del recipiente. Por ejemplo, se puede enroscar una tapa roscada sobre la abertura antes o después de agregar una muestra al recipiente.

Como se describió anteriormente, el soporte sólido puede configurarse como un recipiente, donde el recipiente está configurado para contener un cierto volumen de un fluido (p. ej., gas o líquido). En algunos casos, un soporte sólido que está configurado como recipiente (p. ej., un recipiente de líquido) tiene una superficie interna y una superficie externa. En estas realizaciones, la superficie interna del soporte sólido (p. ej., recipiente) es la superficie del soporte sólido (p. ej., recipiente) que mira hacia el interior del soporte sólido (p. ej., recipiente). La superficie interna puede estar en contacto con el contenido del recipiente. Como tal, el soporte sólido puede incluir una superficie interna del recipiente, tal como una superficie interna de un recipiente de líquido. La superficie exterior del soporte sólido (p. ej., recipiente) es la superficie del soporte sólido (p. ej., recipiente) que mira hacia afuera desde el interior del soporte sólido (p. ej., recipiente). La superficie exterior no entra en contacto con el contenido del recipiente. Como tal, el soporte sólido puede incluir una superficie exterior del recipiente, tal como una superficie exterior de un recipiente de líquido.

En ciertas realizaciones, las composiciones de miembros de unión marcados son composiciones secas. Una composición seca es una composición que incluye una pequeña cantidad de disolvente. Por ejemplo, las composiciones secas pueden incluir una pequeña cantidad de líquido, tal como agua. En algunos casos, una composición seca no incluye sustancialmente disolvente. Por ejemplo, las composiciones secas pueden no incluir sustancialmente ningún líquido, tal como agua. En ciertas realizaciones, una composición seca incluye 25% en peso o menos de disolvente, tal como 20% en peso o menos, o 15% en peso o menos, o 10% en peso o menos, o 5% en peso o menos, o 3% en peso o menos, o 1% en peso o menos, o 0,5% en peso o menos de disolvente. En algunos casos, una composición de tinte seca no es un fluido. En algunos casos, una composición seca es sustancialmente un sólido. Por ejemplo, una composición seca puede tener una viscosidad alta, tal como una viscosidad de 10.000 cP o más, o 25.000 cP o más, o 50.000 cP o más, o 75.000 cP o más, o 100.000 cP o más, o 150.000 cP o más, o 200.000 cP o más, o 250.000 cP o más en condiciones convencionales.

En algunos casos, las composiciones son composiciones liofilizadas. En ciertos casos, una composición liofilizada es una composición en la que se ha eliminado el agua de la composición por sublimación, en la que el agua de la composición sufre una transición de fase de sólido a gas. Por ejemplo, una composición liofilizada puede ser una composición en la que se ha eliminado el agua de la composición congelando la composición (p. ej., congelando agua en la composición de tinte) y a continuación reduciendo la presión que rodea la composición de manera que el agua en la composición sufra sublimación. En ciertos casos, una composición liofilizada incluye agua en una pequeña cantidad, tal como 25% o menos, o 20% o menos, o 15% o menos, o 10% o menos, o 9% o menos, o 8% o menos, o 7% o menos, o 6% o menos, o 5% o menos, o 4% o menos, o 3% o menos, o 2% o menos, o 1% o menos, o 0,5% o menos, o 0,25% o menos, o 0,1% o menos de agua medido por valoración de Karl Fischer (KF). En algunos casos, una composición liofilizada tiene un 3% o menos de agua, medido por valoración de Karl Fischer. En algunos casos, una composición liofilizada tiene un 1% o menos de agua, medido por valoración de Karl Fischer. En algunos casos, una composición liofilizada tiene un 0,5% o menos de agua, medido por valoración de Karl Fischer. Las composiciones liofilizadas pueden incluir aditivos y/o excipientes, tales como un estabilizador. En algunos casos, la composición liofilizada incluye un estabilizador, tal como un azúcar o un polialcohol. Los azúcares y polialcoholes adecuados para su uso en composiciones liofilizadas incluyen azúcares que son compatibles con los otros reactivos, tampones, tintes y componentes de muestra que se están utilizando. Los ejemplos de azúcares adecuados incluyen, pero sin limitarse a, sacarosa, maltosa, trehalosa, 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina (β -HPCD), lactosa, glucosa, fructosa, galactosa, glucosamina y similares, y combinaciones de las mismas. En ciertos casos, el azúcar es un disacárido. Por ejemplo, el disacárido puede ser sacarosa. Los ejemplos de polialcoholes adecuados incluyen, pero no se limitan a, manitol, glicerol, eritritol, treitol, xilitol, sorbitol y similares, y combinaciones de los mismos.

50 DISPOSITIVOS Y SISTEMAS

Los aspectos de la invención incluyen adicionalmente sistemas para su uso en la práctica de los métodos en cuestión. Los sistemas de la invención pueden incluir un sistema de citometría de flujo configurado para analizar muestras celulares (p. ej., sangre completa, PBMC, etc.) midiendo señales tales como FSC, SSC, ALL, emisión de fluorescencia (p. ej., como emisión máxima), masa, masa molecular, etc. Las etapas de los métodos descritos en las secciones anteriores pueden ser realizados por el sistema de citometría de flujo.

En algunos casos, el citómetro de flujo incluye: un canal de flujo; un módulo detector que incluye un primer detector configurado para recibir una primera señal de la región de ensayo del canal de flujo y un segundo detector configurado para recibir una segunda señal de la región de ensayo del canal de flujo. El citómetro de flujo puede incluir adicionalmente de manera opcional al menos una primera fuente de luz configurada para dirigir la luz a una región de ensayo del canal de flujo (donde en algunos casos el citómetro incluye dos o más fuentes de luz). Además, adicionalmente de manera opcional, el citómetro de flujo puede incluir uno o más detectores y/o fuentes de luz

adicionales para la detección de una o más señales adicionales. Las una o más señales adicionales pueden ser producidas por una o más marcas detectables adicionales.

El citómetro de flujo puede configurarse para producir un conjunto de datos. El conjunto de datos puede incluir datos de señal (p. ej., espectros de excitación y/o emisión de fluorescencia, intensidad de fluorescencia, máximos de emisión de fluorescencia, FSC, SSC, ALL o combinaciones de los mismos) para cada evento en el conjunto de datos.

El sistema de citometría de flujo también puede incluir una "unidad de procesamiento de datos", p. ej., cualquier combinación de equipo informático y/o soporte lógico que realice las funciones que se le exigen. Por ejemplo, cualquier unidad de procesamiento de datos del presente documento puede ser un microprocesador digital programable, como el disponible en forma de controlador electrónico, ordenador central, servidor u ordenador personal (de escritorio o portátil). Cuando la unidad de procesamiento de datos sea programable, la programación adecuada puede comunicarse desde una ubicación remota a la unidad de procesamiento de datos, o guardarse previamente en un producto de programa informático (tal como un medio de almacenamiento portátil o fijo legible por ordenador, ya sea basado en dispositivos magnético, óptico o de estado sólido).

El sistema de citometría de flujo puede incluir adicionalmente una "memoria" que es capaz de almacenar información de modo que sea accesible y recuperable en una fecha posterior por un ordenador. Se puede elegir cualquier estructura de almacenamiento de datos conveniente, en base a los medios utilizados para acceder a la información almacenada. En ciertos aspectos, la información puede almacenarse en una "memoria permanente" (es decir, memoria que no se borra por la terminación del suministro eléctrico a un ordenador o procesador) o "memoria no permanente". El disco duro del ordenador, el CD-ROM, el disquete, la memoria USB portátil y el DVD son ejemplos de memoria permanente. La Memoria de Acceso Aleatorio (RAM por sus siglas en inglés) es un ejemplo de memoria no permanente. Un archivo en la memoria permanente puede ser editable y reescribible.

La memoria puede almacenar un "módulo" para que lo ejecute la unidad de procesamiento de datos, en donde el módulo está configurado para transformar el conjunto de datos de un número (X) de conjuntos de señales a un número (Y) de conjuntos de densidad de marcadores, en donde $Y > X$. Los conjuntos de densidad de marcador pueden incluir datos de expresión de marcadores (p. ej., niveles y/o cantidades de marcadores celulares, señales de marcadores detectables correspondientes a marcadores celulares, etc.) para cada evento celular en el conjunto de datos o en una población del mismo. El módulo se puede configurar para transformar el conjunto de datos en función de una categorización de eventos (p. ej., eventos celulares) en el conjunto de señales. Por ejemplo, la misma señal fluorescente obtenida de dos eventos celulares categorizados en poblaciones separadas puede ser proporcionada por diferentes marcas detectables específicas para diferentes marcadores celulares. El módulo puede configurarse para distinguir marcas detectables (p. ej., marcas detectables que proporcionan una señal sustancialmente idéntica) en función de la categorización.

En ciertos aspectos, el módulo puede configurarse para categorizar los eventos celulares antes de transformar el conjunto de datos. Adicionalmente, el módulo puede configurarse para categorizar los eventos celulares en función de las mediciones de FSC, SSC, ALL, emisión de fluorescencia o combinaciones de los mismos. En otros aspectos, los eventos celulares pueden ser categorizados por un operador (es decir, manualmente) como se describió anteriormente.

Además del dispositivo sensor y el módulo de procesamiento de señales, p. ej., como se describe anteriormente, los sistemas de la invención pueden incluir una serie de componentes adicionales, tales como dispositivos de salida de datos, p. ej., monitores y/o altavoces, dispositivos de entrada de datos, p. ej., puertos de interfaz, teclados, etc., componentes de manejo de fluidos, fuentes de alimentación, etc.

Los sistemas y métodos de citometría de flujo adecuados para analizar muestras incluyen, pero sin limitarse a, los descritos en Ormerod (ed.), *Flow Cytometry: A Practical Approach*, Oxford Univ. Press (1997); Jaroszeski et al. (eds.), *Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology* Num. 91, Humana Press (1997); *Practical Flow Cytometry*, 3.^a ed., Wiley-Liss (1995); Virgo, et al. (2012) *Ann Clin Biochem.* enero; 49(pt 1):17-28; Linden, et. al., *Semin Thromb Hemost.* 2004 octubre; 30(5):502-11; Allison, et al. *J Pathol.* diciembre de 2010; 222(4):335-344; y Herbig et al. (2007) *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 24(3):203-255. En ciertos casos, los sistemas de citometría de flujo de interés incluyen los citómetros de flujo FACSCanto™ y FACSCanto II™ de BD Biosciences, sistemas FACS Vantage™ de BD Biosciences FACSort™ de BD Biosciences FACSCount™ de BD Biosciences, FACScan™ de BD Biosciences y FACS Calibur™ de BD Biosciences, clasificador de células Influx™ de BD Biosciences, citómetro de flujo C6 Accuri™ de BD Biosciences; citómetro de flujo LSRFortessa™ de BD Biosciences, Citómetro de flujo LSRFortessa™ X-20 de BD Biosciences, citómetro de flujo FACSVerse™ de BD Biosciences, Citómetros de flujo FACS Aria™ III y BD FACS Aria™ Fusion de BD Biosciences, citómetro de flujo FACS Jazz™ de BD Biosciences, citómetro de flujo BD FACS Lyric™, o similares.

En ciertas realizaciones, los sistemas en cuestión son sistemas de citómetros de flujo que incorporan uno o más componentes de los citómetros de flujo descritos en las Patentes de Estados Unidos Num. 3.960.449; 4.347.935; 4.667.830; 4.704.891; 4.770.992; 5.030.002; 5.040.890; 5.047.321; 5.245.318; 5.317.162; 5.464.581; 5.483.469; 5.602.039; 5.620.842; 5.627.040; 5.643.796; 5.700.692; 6.372.506; 6.809.804; 6.813.017; 6.821.740; 7.129.505; 7.201.875; 7.544.326; 8.140.300; 8.233.146; 8.753.573; 8.975.595; 9.092.034; 9.095.494 y 9.097.640.

En algunos casos, los sistemas pueden incluir adicionalmente una muestra celular (p. ej., cargada en el canal de flujo), preparada de acuerdo con cualquiera de los aspectos de los métodos en cuestión descritos anteriormente. En ciertos aspectos, el citómetro de flujo puede ser un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) o un citómetro de flujo automatizado o semiautomatizado que incluye opcionalmente soporte lógico de citometría de flujo personalizado semiautomatizado y/o manejo de líquidos semiautomatizado o totalmente automatizado para tinción, o citometría de flujo semiautomatizada o automatizada para la adquisición de datos y algoritmos estandarizados para el análisis de datos automatizado. En ciertos casos, el dispositivo puede ser un sistema de alto rendimiento o incluir un componente de alto rendimiento.

UTILIDAD

10 La presente divulgación proporciona métodos para la identificación de subpoblaciones de células recolectadas de sujetos que se sospecha que tienen TB, sujetos que se sabe que tienen TB y pacientes que están siendo tratados contra TB y similares. Tales métodos tienen una serie de aplicaciones útiles que se describen a continuación.

15 Como se revisó anteriormente, las evaluaciones de TB obtenidas de acuerdo con las realizaciones de la invención encuentran uso en aplicaciones de diagnóstico y seguimiento de tratamiento. Por ejemplo, las evaluaciones de TB encuentran uso en aplicaciones de diagnóstico, tales como el diagnóstico de la presencia de TB, el diagnóstico del tipo de TB, p. ej., LTBI, etc., el diagnóstico de la transición de LTBI a ATB, etc.

20 Los aspectos de los métodos descritos en el presente documento incluyen la identificación de subpoblaciones de células que expresan biomarcadores de TB por encima o por debajo de un nivel umbral particular útil para obtener una firma de biomarcador de TB que se puede usar para el seguimiento de la progresión de la TB en un sujeto, p. ej., mediante la detección de una primera firma de biomarcador de una muestra de sangre obtenida de un sujeto en un primer momento y la detección de una segunda firma de biomarcador de una muestra de sangre en un segundo momento y la comparación de la primera y la segunda firmas de biomarcador para realizar una evaluación de la progresión de la TB, en donde la evaluación proporciona el seguimiento de la progresión de la TB desde el primer punto de tiempo hasta el segundo punto de tiempo. Se puede realizar un seguimiento de la progresión de la TB en pacientes con TB que se someten a tratamiento o pacientes que no padecen TB, p. ej., aquellos pacientes que se sabe que están infectados con TB, p. ej., aquellos que tienen TB latente, pero que no se someten a tratamiento. En ciertos casos, se pueden utilizar más de dos puntos de tiempo para controlar la progresión de la TB.

25 En ciertas realizaciones, el método de seguimiento de la progresión de la TB en un sujeto permite detectar un patrón de firmas de biomarcadores presentes en una pluralidad de muestras, p. ej., muestras de sangre, obtenidas de un sujeto en más de dos puntos de tiempo, tal como tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o diez o más. En general, los puntos de tiempo para detectar un patrón de firmas de biomarcadores pueden estar separados por cualquier cantidad de tiempo que se desee. Por ejemplo, el primer punto de tiempo y el segundo punto de tiempo pueden estar separados por menos de 1 semana, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 6 meses, o aproximadamente 1 año o más, tal como aproximadamente 3 años o más.

30 En general, un experto en la técnica apreciará que la duración del tiempo entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal debe ser suficiente para proporcionar un seguimiento de la progresión de la enfermedad de TB, p. ej., el seguimiento de TB durante el tratamiento de la TB.

35 En ciertas realizaciones, los métodos de seguimiento de la TB presentados en el presente documento permiten el seguimiento paralelo de la progresión de la enfermedad y el tratamiento de la enfermedad, p. ej., durante un régimen de tratamiento para la TB. En tales realizaciones, el método de seguimiento de la TB durante el tratamiento proporcionará información sobre si el tratamiento está mejorando la afección, o si no tiene ningún efecto o tiene un efecto adverso sobre la afección. En tales realizaciones, el primer punto de tiempo puede ser justo antes, al mismo tiempo que o justo después del inicio de un régimen de tratamiento y el segundo punto de tiempo puede ser un punto de tiempo después de un período de tratamiento deseado. Por ejemplo, en tales realizaciones, el segundo punto de tiempo puede ser aproximadamente 1 semana o más después del inicio del tratamiento, incluyendo aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, o más. Por ejemplo, la detección de la firma del biomarcador presente en una muestra de sangre obtenida del sujeto puede determinarse aproximadamente una vez por semana o más, incluso una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada 2 meses, una vez cada 3 meses, una vez cada 4 meses, una vez cada 5 meses, una vez cada 6 meses, una vez al año, una vez cada 2 años y una vez cada 3 años, para realizar el seguimiento de la progresión de la TB y la eficacia del régimen de tratamiento.

40 Ciertos aspectos de los métodos, dispositivos, sistemas y kits presentados en el presente documento proporcionan una mayor eficacia del seguimiento del tratamiento y, por lo tanto, una gran eficacia del tratamiento, ya que los tratamientos pueden adaptarse a la respuesta al tratamiento de un paciente en particular. Por ejemplo, en algunos

casos, el tratamiento puede prolongarse más de lo previsto al inicio del tratamiento según una evaluación de TB realizada durante el tratamiento que indica que es necesario un tratamiento más prolongado. En otros casos, el tratamiento puede interrumpirse antes de lo previsto al inicio del tratamiento en función de una evaluación de TB realizada durante el tratamiento que indica que la duración del tratamiento prescrito inicialmente es innecesaria.

- 5 En ciertos aspectos de la presente divulgación, las evaluaciones de TB se realizan mediante la comparación de evaluaciones o mediciones de biomarcadores o firmas de biomarcadores con un patrón de referencia. En ciertas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento son útiles para obtener tales patrones de referencia. En algunos casos, el patrón de referencia con el que se compara una muestra de un sujeto o paciente en particular, como se describe en el presente documento, es la muestra del propio paciente o del sujeto, p. ej., la muestra del propio paciente o del sujeto recolectada en un momento anterior. En algunas realizaciones, el seguimiento de la TB se puede llevar a cabo realizando evaluaciones de la TB, como se describe en el presente documento, mediante la comparación de muestras, p. ej., muestras de sangre de un paciente o células de un paciente, adquiridas en diferentes momentos y/o en diferentes condiciones, p. ej., en diferentes momentos durante un régimen de tratamiento o bajo diferentes condiciones de tratamiento, p. ej., bajo diferentes regímenes de tratamiento o durante diferentes fases de tratamiento.

15 REACTIVOS Y KITS

También se proporcionan reactivos, dispositivos y kits de los mismos para poner en práctica uno o más de los métodos descritos anteriormente. Los reactivos en cuestión, los dispositivos y los kits de los mismos pueden variar mucho. Los reactivos y dispositivos de interés incluyen los mencionados anteriormente con respecto a los métodos de detección de biomarcadores e identificación de subpoblaciones de células que expresan biomarcadores, p. ej., mediante citometría de flujo. Los kits en cuestión pueden incluir una primera marca detectable que se une específicamente a un primer marcador celular y una segunda marca detectable que se une específicamente a un segundo biomarcador. Las marcas detectables primera y segunda pueden proporcionar una señal sustancialmente idéntica o señales sustancialmente diferentes. Una marca detectable puede incluir un dominio de marca y un miembro de unión específica para un biomarcador, como se describe en la sección anterior. Como se analizó anteriormente, los biomarcadores específicos de interés para los que un kit dado puede incluir un miembro de unión detectable incluyen, pero sin limitarse a: CD154, CD45RA, CD197(CCR7), CD27, CD28, CD69, IFN- γ , IL-2, TNF- α , Ki-67, HLA-D4, CD-38, CXCR3, CCR6, CD161, CD3, CD4 y/o CD8, p. ej., como se describe anteriormente.

Los kits útiles para poner en práctica uno o más de los métodos descritos anteriormente pueden incluir uno o más de tales reactivos y dispositivos que incluyen, p. ej., reactivos y dispositivos para la detección de biomarcadores, reactivos y dispositivos para la identificación de subpoblaciones de células que expresan uno o más biomarcadores, reactivos y dispositivos para recolectar, almacenar, preparar, procesar, muestras antes o durante la ejecución de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, y dispositivos para interpretar, almacenar, convertir, mostrar o difundir datos relacionados con las evaluaciones realizadas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Además, los kits pueden incluir uno o más reactivos de calibración o de referencia, p. ej., para su uso en la calibración de un dispositivo, incluyendo, p. ej., un citómetro de flujo, o para la configuración de un dispositivo, incluyendo, p. ej., la configuración de un citómetro de flujo, incluyendo, p. ej., la configuración de valores umbral, p. ej., valores umbral de biomarcadores, que se van a utilizar en evaluaciones como se describe en el presente documento. Además, el kit puede incluir una o más composiciones adicionales que emplean, incluyendo, pero sin limitarse a: tampones, diluyentes, agentes de lisis celular, etc., que se pueden utilizar en un ensayo dado. Los componentes anteriores pueden estar presentes en recipientes separados o uno o más componentes pueden combinarse en un solo recipiente, p. ej., un vial de vidrio o plástico.

Además, el kit puede incluir una o más marcas detectables adicionales que se unen específicamente a marcadores celulares adicionales, p. ej., marcadores celulares que identifican una característica adicional de una célula, p. ej., una característica distinta de la expresión de un biomarcador de TB particular sobre la superficie de la célula. Las marcas detectables pueden unirse a marcadores celulares directa o indirectamente, es decir, a través de la unión común de un mediador de unión a una marca. Las marcas detectables se pueden proporcionar en recipientes separados o mezcladas en el mismo recipiente.

El kit también puede incluir uno o más reactivos de fijación celular, como paraformaldehído, glutaraldehído, metanol, acetona, formalina o cualquier combinación o tampón de los mismos. Adicionalmente, el kit puede incluir un reactivo de permeabilización celular, tal como metanol, acetona o un detergente (p. ej., tritón, NP-40, saponina, tween 20, digitonina, leucoperma o cualquier combinación o tampón de los mismos. Otros inhibidores del transporte de proteínas, reactivos de fijación y reactivos de permeabilización celular familiares para el experto en la materia están dentro del alcance de los kits en cuestión.

El kit puede incluir adicionalmente reactivos para realizar un ensayo de citometría de flujo. Los ejemplos de dichos reactivos incluyen tampones para al menos uno de reconstitución y dilución de la primera y segunda moléculas detectables, tampones para poner en contacto una muestra celular con una o ambas de la primera y segunda moléculas detectables, tampones de lavado, células de control, cuentas de control, cuentas fluorescentes, para calibración de citómetros de flujo y combinaciones de los mismos.

Las marcas y/o reactivos detectables descritos anteriormente pueden proporcionarse en forma líquida o seca (p. ej.,

liofilizada). Cualquiera de los componentes anteriores (marcas y/o reactivos detectables) puede estar presentes en recipientes separados (p. ej., tubos, frascos o pocillos separados en una tira o placa de pocillos múltiples). Además, uno o más componentes pueden combinarse en un solo recipiente, p. ej., un vial, tubo o frasco de vidrio o plástico.

5 Además de los componentes anteriores, los kits en cuestión pueden incluir adicionalmente instrucciones para poner en práctica los métodos en cuestión. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits en cuestión en una variedad de formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, p. ej., un trozo o trozos de papel en los que se imprime la información, en el paquete del kit, en un prospecto, etc. otro medio sería un medio legible por ordenador, p. ej., un disquete, un CD, una memoria extraíble, una memoria USB, etc., en el que se ha grabado la información. Otro medio más que puede estar presente es una dirección de sitio web que puede usarse a través de Internet para acceder a la información en un sitio eliminado. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

10 Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

15 I. Protocolo

Las muestras de sangre completa se activan *in vitro* con una dosis unitaria de reactivo estimulante seco que contiene mezclas de péptidos de 15 unidades específicos de TB que representan proteínas MTB (p. ej., ESAT-6, CFP) o un estímulo de control positivo. La activación se produce en presencia de anticuerpos coestimuladores CD28+CD49d y un inhibidor de la secreción (p. ej., Brefeldina-A (BFA), monensina), junto con CD154 conjugado con un tinte fluorescente. Tiempo de activación: 6-24 horas a 37°C. Después de la activación, la muestra de sangre activada se trata con EDTA (10 mM) durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, los glóbulos rojos se lisan con reactivo de lisis, seguido de lavado de las células con PBS/BSA/azida (tampón de lavado). La muestra resultante se tiñe con una dosis unitaria de un panel de anticuerpos conjugados fluorescentes CD3, CD4 y CD8, y marcadores de diferenciación de memoria central de células T (CD45RA, CCR7, CD27, CD28) que definen subconjuntos de células de memoria (subconjuntos de Memoria Central y subconjuntos de Memoria Efectora). Las muestras teñidas se analizan utilizando un citómetro de flujo (p. ej., FACSLyric). El análisis de datos de citometría de flujo se realiza utilizando un algoritmo de análisis para calcular la frecuencia neta (es decir, la respuesta) de las células T activadas específicas de TB después de restar la respuesta de la muestra de control no estimulada.

30 Lo anterior simplemente ilustra los principios de la invención. Se apreciará que los expertos en la técnica serán capaces de idear varias disposiciones que, aunque no se describen o muestran explícitamente en el presente documento, incorporan los principios de la invención y están incluidas dentro de su alcance. Además, todos los ejemplos y el lenguaje condicional enumerados en el presente documento están destinados principalmente a ayudar al lector a comprender los principios de la invención y los conceptos aportados por los autores de la presente invención para promover la técnica, y deben interpretarse sin limitación a tales ejemplos y condiciones enumerados específicamente.

35 Por lo tanto, no se pretende que el alcance de la presente invención se limite a las realizaciones ilustrativas mostradas y descritas en el presente documento. Más bien, el alcance de la presente invención se materializa en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener una evaluación de tuberculosis para un sujeto, comprendiendo el método:
 - (a) analizar una muestra activada con tuberculosis (TB) del sujeto para detectar la presencia de:
 - (i) células T CD154+; y
 - (ii) células T que tienen un fenotipo de memoria central 1 (CM1) (CD45RA-, CD197(CCR7)+, CD27+, CD28+) correspondiente a infección tuberculosa latente (LTBI), un fenotipo de memoria central 2 (CM2) (CD45RA-, CD197(CCR7)+/-, CD27+, CD28+) correspondiente a la aparición de tuberculosis activa subclínica (ATB) o un fenotipo de memoria central 3 (CM3) (CD45RA-, CD197 (CCR7)-, CD27+, CD28+) correspondiente a ATB subclínica más avanzada;
 - 10 para obtener una firma de biomarcador de TB; y
 - (b) obtener una evaluación de tuberculosis para el sujeto a partir de la firma del biomarcador de TB, en donde la evaluación de tuberculosis es una de las siguientes: CM1, CM2 o CM3.
2. El método según la Reivindicación 1, en donde el método comprende cuantificar el número o la proporción de
 - (i) células T CD154+; y
 - (ii) células T que tienen un fenotipo CM 1 (CD45RA-, CD197(CCR7)+, CD27+, CD28+), un fenotipo CM2 (CD45RA-, CD197 (CCR7) +/-, CD27+, CD28+) + o un fenotipo CM3 (CD45RA-, CD197 (CCR7)-, CD27+, CD28+), en donde el número o proporción de células T CD154+ y células T que tienen un fenotipo CM1, un fenotipo CM2 o un fenotipo CM3 indican que el sujeto tiene una infección tuberculosa latente (LTBI) o indican una transición entre LTBI y ATB.
- 20 3. El método según cualquiera de las Reivindicaciones 1 y 2, en donde el método no incluye analizar la muestra en busca de ningún marcador intracelular.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra es una muestra de sangre.
5. El método según la Reivindicación 4, en donde la muestra de sangre es una muestra de sangre completa.
- 25 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende adicionalmente la producción de una muestra activada con TB.
7. El método según la Reivindicación 6, en donde la producción de la muestra activada con TB comprende: poner en contacto una muestra celular obtenida del sujeto con un antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB).
8. El método según la Reivindicación 7, en donde el método comprende adicionalmente poner en contacto la muestra con un reactivo coestimulador.
- 30 9. El método según la Reivindicación 8, en donde el reactivo coestimulador comprende miembros de unión específica de CD28 y CD49d.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la firma del biomarcador de TB para la muestra se obtiene analizando por citometría de flujo la muestra activada con TB.
- 35 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la evaluación de la tuberculosis comprende una evaluación de si el sujeto tiene una infección tuberculosa latente (LTBI) o si el sujeto está en transición entre LTBI y ATB o si el sujeto está respondiendo a un régimen de tratamiento contra la tuberculosis (TB).
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende adicionalmente identificar un régimen de tratamiento contra la TB basado en la evaluación de la tuberculosis.
13. Una composición para la evaluación de la tuberculosis, comprendiendo la composición:
- 40 miembros de unión específica marcados para cada uno de CD154, CD45RA, CD197 (CCR7), CD27 y CD28.
14. Un kit que comprende:
- miembros de unión específica marcados para cada uno de CD154, CD45RA, CD197 (CCR7), CD27 y CD28.
15. Un sistema de citometría de flujo que comprende:
- un citómetro de flujo que comprende una celda de flujo;

ES 2 950 436 T3

una fuente de luz configurada para dirigir la luz a una región de ensayo de la celda de flujo;
un detector configurado para recibir luz de la región de ensayo; y
una muestra activada con TB que comprende miembros de unión específica marcados para cada uno de CD154, CD45RA, CD197 (CCR7), CD27 y CD28.

