

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 959 857**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/35 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2019 PCT/EP2019/064885**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2019 WO19234196**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2019 E 19728095 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2023 EP 3803400**

54 Título: **Método *in vitro* para el diagnóstico o la detección de micobacterias no tuberculosas**

30 Prioridad:

06.06.2018 EP 18382403

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.02.2024

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ EN
CIÈNCIES DE LA SALUT GERMANS TRIAS I
PUJOL (33.3%)
Carretera del Canye s/n, Cami de les Escoles
08916 Badalona, Barcelona, ES;
OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION (33.3%)
y
CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN RED M.P. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**DOMÍNGUEZ BENÍTEZ, JOSÉ ANTONIO;
LATORRE RUEDA, IRENE;
VILLAR-HERNÁNDEZ, RAQUEL y
TORRELLES, JORDI**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones:

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

ES 2 959 857 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

Método *in vitro* para el diagnóstico o la detección de micobacterias no tuberculosas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas y se refiere al campo médico y/o veterinario. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método *in vitro* (a continuación en el presente documento, método de la invención) para detectar una respuesta inmunitaria contra especies de micobacterias no tuberculosas (NTM). En consecuencia, puede usarse en el diagnóstico de infecciones por NTM. Particularmente, el método de la invención puede usarse para el diagnóstico de enfermedades directamente provocadas por infecciones por NTM, por ejemplo: infecciones pulmonares, linfadenitis e infecciones de la piel y partes blandas. Específicamente, puede usarse para identificar infecciones por NTM en niños a los que se les ha diagnosticado fibrosis quística, en pacientes que están padeciendo enfermedades respiratorias crónicas, incluyendo enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y, entre otros, en adultos inmunodeprimidos. Por otro lado, el método de la invención puede usarse para el diagnóstico diferencial de infecciones por NTM frente a infecciones por tuberculosis (TB) en niños con linfadenopatía. Además, el método de la invención también puede usarse para diferenciar una respuesta inmunitaria a NTM a partir de infección por tuberculosis latente por *Mycobacterium* (LTBI), lo que permite un diagnóstico más preciso de LTBI, particularmente en la población pediátrica.

20 **Antecedentes de la invención**

Históricamente, las infecciones humanas notificadas debidas a *Mycobacterium spp.* eran debidas casi exclusivamente a *Mycobacterium tuberculosis*. El amplio impacto público de esta infección es legendario. Más recientemente, se han identificado otras especies de *Mycobacterium spp.* que provocan una enfermedad clínica similar a la TB y cada vez son más reconocidas en todo el mundo. Estos organismos se denominan NTM.

Las NTM pueden provocar una amplia gama de infecciones. Aunque se han descrito más de 150 especies diferentes de NTM, las infecciones pulmonares son más comúnmente debidas al complejo de *Mycobacterium avium* (MAC), *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium abscessus*. Las infecciones por NTM también son de particular importancia en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas (fibrosis quística, EPOC, etc.). Además de infecciones pulmonares, las NTM pueden provocar infecciones en otras localizaciones. En niños, las NTM provocan cuatro síndromes clínicos principales: linfadenitis, infección de la piel y partes blandas, enfermedades pulmonares (predominantemente en niños con afecciones pulmonares subyacentes) y enfermedad diseminada (en niños inmunodeprimidos).

La identificación de NTM en muestras pulmonares no siempre equivale a una infección activa. Entonces se requiere un transcurso prolongado de terapia con una combinación de fármacos. Además, una infección recurrente con nuevas cepas de micobacterias o una recaída de la infección no es infrecuente, siendo apropiado en algunos casos seleccionados una resección quirúrgica. Hoy en día, todavía no se dispone de métodos de diagnóstico complementarios y definitivos.

Por tanto, disponer de un método de diagnóstico para la identificación de pacientes que realmente padecen una infección por NTM ayudaría a recetar el tratamiento adecuado a aquellos que realmente lo necesitan, reduciendo en consecuencia las terapias innecesarias, con la posterior reducción en la resistencia a los antibióticos y en los costes del tratamiento del paciente.

Particularmente, existe una necesidad real de métodos fiables para el diagnóstico de enfermedades directamente provocadas por infecciones por NTM. Por ejemplo, las infecciones pulmonares, la linfadenitis y las infecciones de la piel y partes blandas son las enfermedades más comúnmente descritas, que están provocadas por infecciones por NTM. Entre ellas, puede destacarse: i) la colonización/infección de las vías respiratorias por NTM en niños a los que se les ha diagnosticado fibrosis quística y ii) infección por NTM de pacientes que padecen enfermedades respiratorias crónicas y pacientes inmunodeprimidos.

Es importante considerar que los métodos de diagnóstico que ayudan en la distinción entre colonización e infección serían muy relevantes, particularmente en el caso de pacientes que padecen enfermedades respiratorias crónicas y pacientes inmunodeprimidos. La precisión en el diagnóstico es necesaria porque la infección por NTM requiere un transcurso prolongado de terapia con una combinación de fármacos, siendo apropiada en algunos casos seleccionados una resección pulmonar quirúrgica. Hoy en día, todavía no se dispone de métodos complementarios y definitivos para el diagnóstico de infecciones por NTM. Los métodos convencionales usados en la actualidad para el diagnóstico de infecciones por NTM, básicamente el análisis del cultivo de esputo combinado con criterios clínicos, no pueden ayudar en la distinción entre colonización e infección activa. Por tanto, disponer de un método de diagnóstico con el objetivo de identificar a pacientes que realmente padecen una infección por NTM (no simplemente colonización) ayudaría a recetar el tratamiento adecuado para dichos pacientes. Esto también reduciría las terapias innecesarias y, en consecuencia, los efectos adversos, reduciendo también la resistencia a los antibióticos y los costes del tratamiento del paciente. La administración del tratamiento adecuado también mejoraría la calidad de vida

de los pacientes, reduciendo también el número de ocasiones que acuden a los hospitales.

Además, existe una necesidad real de métodos fiables centrados en el diagnóstico diferencial entre NTM y LTBI en niños con linfadenopatía, cuando hay una sospecha de TB activa. El tratamiento de la linfadenopatía en niños requiere la extracción de la linfadenopatía mediante cirugía y también la receta de un tratamiento específico que es diferente si la linfadenopatía es debida a infecciones por NTM (principalmente *M. avium*) o *M. tuberculosis*.

Adicionalmente, existe una necesidad real de métodos de diagnóstico con el objetivo de diagnosticar infecciones por NTM en situaciones en las que la respuesta inmunitaria a NTM confunde los resultados de pruebas cutáneas de tuberculina (TST). Diagnosticar LTBI en niños es muy importante porque el riesgo de progresión a TB activa grave es alto, especialmente en niños pequeños. Las pautas recomiendan el uso de la TST y el ensayo de liberación de interferón gamma (IGRA). Los IGRA son pruebas más específicas que la TST, dado que los antígenos usados para estimular las células T sólo están presentes en *M. tuberculosis*. Sin embargo, debido al alto riesgo de progresión en el caso de una infección real y la gravedad de la TB en niños, cuando se notifica TST positiva e IGRA negativo, con frecuencia se considera que el paciente está infectado y se trata como un paciente con LTBI, especialmente en niños no vacunados con BCG. Los inventores de la presente invención han observado que a un gran número de pacientes no se les diagnostica de manera apropiada que padecen LTBI, porque algunos de estos pacientes responden a la TST debido a una reacción cruzada con la sensibilización previa con NTM. En consecuencia, existe una necesidad real de identificar de manera adecuada las infecciones por NTM con el fin de administrar la terapia adecuada, evitando tratamientos innecesarios debidos a resultados de TST falsos positivos. De hecho, el uso de una prueba *in vitro* capaz de identificar la sensibilización con NTM permitiría la identificación de resultados de TST falsos positivos y, en consecuencia, reduciría el número de tratamientos de LTBI innecesarios en niños. Por tanto, se reducirían considerablemente la alarma social y el coste del tratamiento global de los casos (tratamiento del paciente, estudios de rastreo de contactos, cribados de LTBI en colegios).

En consecuencia, tal como se explicó anteriormente, el diagnóstico diferencial de NTM es una clara necesidad médica insatisfecha. No obstante, hoy en día no existe ninguna prueba en el mercado que use antígenos específicos para la estimulación de células T para diagnosticar específicamente infecciones por NTM. Aunque la TST y los IGRA son pruebas de diagnóstico aprobadas para identificar LTBI, no existe ningún procedimiento para las infecciones por NTM.

El documento WO02/066985 divulga que el núcleo lipídico invariante de un GPL de *Mycobacterium avium* derivado de la membrana celular se usa como principio activo en un ensayo inmunológico para distinguir entre infecciones por tuberculosis y por NTM, en particular infecciones por el complejo de *Mycobacterium avium* (MAC), que influirá en la elección del tratamiento.

Kitada *et al.* 2005 (Clin Diagn Lab Immunol 12(1):44-51) divulgan que el antígeno central GPL del complejo de *Mycobacterium avium* (MAC) de micobacterias no tuberculosas (NTM) se usa como antígeno en un inmunoensayo enzimático para diagnosticar enfermedad pulmonar por MAC.

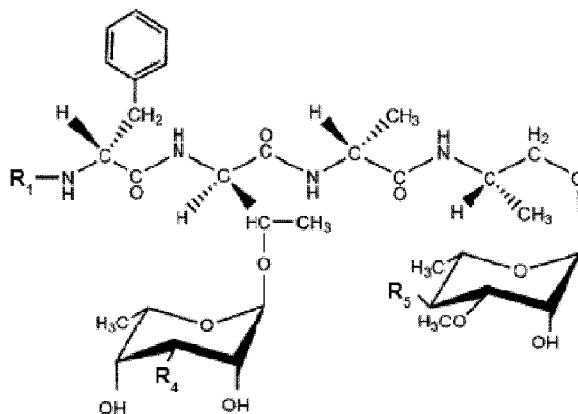
Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

Los inventores de la presente invención, usando precisamente antígenos nsGPL de *M. avium*, han sido capaces de identificar no sólo infecciones provocadas por *M. avium* sino también infecciones provocadas por cualquier NTM; en particular por cualquiera de las siguientes especies bacterianas seleccionadas del lista que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium farcinogenes*, *Mycobacterium habana*, *Mycobacterium hominis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium porcinum*, *Mycobacterium senegalense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium scrofulaceum* y *Mycobacterium simiae*; más particularmente por cualquiera de las siguientes especies bacterianas seleccionadas de la lista que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium xenopi*. Cabe señalar que las tablas 1 y 5 a 7 muestran claramente resultados positivos obtenidos después de la estimulación con glicopeptidolípidos no específicos de serovar (nsGPL), tales como ns4GPL o ns8GPL, o *Mycobacterium smegmatis*. Cabe señalar que ambas estructuras químicas, ns4GPL o ns8GPL, son químicamente idénticas. Además, cabe señalar que, tal como se muestra en las figuras 1 a 7, la estimulación con tales glicopeptidolípidos no específicos de serovar ha proporcionado resultados positivos para *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium xenopi*. En cuanto a *Mycobacterium fortuitum*, en los presentes ejemplos se muestran resultados negativos, puesto que los pacientes de los que se tomaron las muestras fueron colonizados con estas bacterias sin producir infección (estos resultados están en consonancia con los resultados mostrados en la figura 7, donde está claro que los glicopeptidolípidos no específicos de serovar de la invención son útiles para diferenciar entre la colonización bacteriana de un individuo y la infección (manifestación clínica de la enfermedad)).

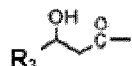
Por tanto, la presente invención da lugar a una herramienta versátil para la identificación de infecciones provocadas por cualquier NTM, no sólo por *M. avium*. Este efecto técnico se ha logrado inesperadamente en la presente invención, tal como se muestra en las tablas 1 y 5 a 7, usando precisamente los nsGPL de fórmula I derivados de *M. avium*. Por tanto, la presente invención, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas, se centra en la

5 detección de infecciones provocadas no sólo por *M. avium* sino también provocadas por cualquier NTM, usando el antígeno de fórmula I, o un antígeno que comprende la estructura química de fórmula I, o cualquier isómero del mismo:



Fórmula I

en la que R₁ es



en la que R₃ es una cadena de alquilo o alquenoilo que tiene desde 1 hasta 34 átomos de carbono;

en la que R₄ es -OH u -OCH₃;

en la que R₅ es -OH u -OCH₃.

Sin embargo, cabe señalar que la identificación de infecciones provocadas por cualquier NTM, en particular por cualquiera de las siguientes especies bacterianas seleccionadas de la lista que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium farcinogenes*, *Mycobacterium habana*, *Mycobacterium hominis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium porcinum*, *Mycobacterium senegalense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium scrofulaceum* y *Mycobacterium simiae*; no sólo se logra mediante antígenos que consisten en o que comprenden la fórmula I, sino mediante cualquiera de los nsGPL de cualquiera de las siguientes bacterias: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium xenopi* o *Mycobacterium smegmatis*.

Por tanto, un aspecto alternativo divulgado en el presente documento, pero no forma parte de la invención, se centra en la detección de infecciones provocadas por cualquier NTM, usando como antígeno cualquiera de los nsGPL, o un antígeno que comprende tales nsGPL, de cualquiera de las siguientes bacterias seleccionadas del grupo que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium xenopi* o *Mycobacterium smegmatis*. En particular, tales nsGPL son capaces de detectar infecciones provocadas por cualquiera de las siguientes especies bacterianas seleccionadas de la lista que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium farcinogenes*, *Mycobacterium habana*, *Mycobacterium hominis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium porcinum*, *Mycobacterium senegalense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium scrofulaceum* y *Mycobacterium simiae*; más particularmente por cualquiera de las siguientes especies bacterianas seleccionadas de la lista que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium xenopi*. Preferiblemente, tales nsGPL son un antígeno de fórmula II, o un antígeno que comprende la estructura química de fórmula II, o cualquier isómero del mismo:

5 En una realización preferida de la fórmula I, R₃ es una cadena de alqueno que tiene 34 átomos de carbono, R₄ es -OCH₃ y R₅ es -OCH₃.

10 O-Me- α -L-Rhap.

Particularmente, el método de la invención para el diagnóstico de infecciones por NTM puede aplicarse en las siguientes situaciones:

- 15 • Para el diagnóstico de enfermedades directamente provocadas por NTM: por ejemplo, infecciones pulmonares, linfadenitis e infecciones de la piel y partes blandas. Particularmente, el método de la invención puede usarse para la identificación de infecciones por NTM en las siguientes situaciones: (i) colonización/infección de las vías respiratorias por NTM en niños a los que se les ha diagnosticado fibrosis quística y (ii) infecciones por NTM en pacientes que están padeciendo enfermedades respiratorias
- 20 crónicas (es decir, EPOC y fibrosis quística) y adultos inmunodeprimidos. Tal como se explicó en los antecedentes de la invención, es importante considerar que la identificación de métodos de diagnóstico que ayuden en la distinción entre colonización e infección sería muy relevante, particularmente en el caso de pacientes que están padeciendo enfermedades respiratorias crónicas. En estas situaciones, el método de la invención ayudará en el diagnóstico de NTM porque un resultado positivo reforzará el papel de la
- 25 infección y un resultado negativo reforzará el papel de la colonización.
- Para el diagnóstico diferencial entre infección por NTM y por TB en niños con linfadenopatía cuando hay una sospecha de TB activa. El tratamiento de la linfadenopatía en niños requiere la extracción de la linfadenopatía mediante cirugía, y también la receta de un tratamiento específico, que es diferente si la
- 30 linfadenopatía es debida a una infección por NTM [principalmente *M. avium*] o una infección por *M. tuberculosis*. El método de la invención ayudará a diferenciar rápidamente entre NTM y TB, con el fin de administrar el tratamiento correcto al paciente.
- Para el diagnóstico de infecciones por NTM en situaciones en las que la respuesta inmunitaria a NTM confunde los resultados de TST en tanto en humanos como en especies animales. El método de la invención, que tiene como objetivo identificar la sensibilización con NTM, reducirá el número de
- 35 tratamientos de LTBI innecesarios y el coste del tratamiento de estos casos y la consecuente alarma social. Un resultado positivo respaldará la idea de una infección por NTM en lugar de una infección LTBI.

40 Particularmente, se usa un glicopeptidolípido no serovar (nsGPL) de *M. avium* como único antígeno de NTM, que es totalmente específico de NTM, como candidato para crear una prueba para el diagnóstico o la identificación de infecciones por NTM. El método de la invención se basa en la detección de citocinas producidas por células T sanguíneas después de la estimulación con antígeno de NTM. Para este propósito, los nsGPL se extrajeron y se analizaron adicionalmente usando cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) para confirmar su pureza.

La presente invención muestra que los nsGPL, en particular los nsGPL de *M. avium*, son antígenos válidos para detectar una respuesta inmunitaria contra cualquier especie de NTM.

50 Los nsGPL, en particular los nsGPL de *M. avium*, descritos en la invención son capaces de actuar como antígeno

estimulante, que a su vez son capaces de diagnosticar las infecciones por NTM.

Esto abre la atractiva posibilidad de crear una prueba única para el diagnóstico de NTM y para evaluar el papel de NTM en el diagnóstico de LTBI. El método de diagnóstico de la invención ayudará a recetar tratamientos adecuados. También reducirá las terapias innecesarias con los consecuentes beneficios previniendo la resistencia a los antibióticos, reduciendo la profilaxis innecesaria para LTBI y también reduciendo el malestar del paciente que debe recibir una terapia innecesaria o inadecuada.

Por tanto, la primera realización de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, se refiere al uso de antígenos GLP no específicos de serovar de *M. avium* de fórmula (I) (véase anteriormente), para el diagnóstico o la detección *in vitro* de infecciones provocadas no sólo por *M. avium* sino también provocadas por cualquier NTM. Se divulga, pero no forma parte de la invención, el uso de un antígeno GLP no específico de serovar, o un antígeno que comprende tal nsGPL, obtenido de una bacteria seleccionada de cualquiera del grupo que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium xenopi* o *Mycobacterium smegmatis*.

También se divulga, pero no forma parte de la invención, el uso de un antígeno de fórmula II, o un antígeno que comprende la estructura química de fórmula II, o cualquier isómero del mismo.

La segunda realización de la presente invención, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas, se refiere al uso de antígenos GLP no específicos de serovar de *M. avium* de fórmula (I) (véase anteriormente), para la diferenciación *in vitro* entre infecciones provocadas no sólo por *M. avium* sino también provocadas por cualquier NTM, a partir de infección por tuberculosis latente. Se divulga, pero no forma parte de la invención, el uso de un antígeno GLP no específico de serovar, o un antígeno que comprende tal nsGPL, obtenido de una bacteria seleccionada de cualquiera del grupo que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium xenopi* o *Mycobacterium smegmatis*. También se divulga, pero no forma parte de la invención, el uso de un antígeno de fórmula II, o un antígeno que comprende la estructura química de fórmula II, o cualquier isómero del mismo.

La tercera realización de la presente invención, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas, se refiere al uso de antígenos GLP no específicos de serovar de *M. avium* de fórmula (I) (véase anteriormente), para decidir si administrar un tratamiento médico a un sujeto que se sospecha que padece una infección provocada no sólo por *M. avium* sino también provocada por cualquier NTM. Se divulga, pero no forma parte de la invención, el uso de un antígeno GLP no específico de serovar, o un antígeno que comprende tal nsGPL, obtenido de una bacteria seleccionada de cualquiera del grupo que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium xenopi* o *Mycobacterium smegmatis*. También se divulga, pero no forma parte de la invención, el uso de un antígeno de fórmula II, o un antígeno que comprende la estructura química de fórmula II, o cualquier isómero del mismo.

La cuarta realización de la presente invención, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas, se refiere a un método *in vitro* para detectar o diagnosticar infecciones provocadas no sólo por *M. avium* sino también provocadas por cualquier NTM, comprendiendo dicho método: a) incubar una muestra biológica obtenida del sujeto con cualquiera de los antígenos mencionados en cualquiera de las realizaciones uno a tres anteriores, es decir, antígenos GLP no específicos de serovar de *M. avium* de fórmula (I), b) cuantificar el nivel secretado de al menos una citocina, c) en el que si el nivel de citocina cuantificado en la etapa (b) es mayor que el nivel de control de referencia, es indicativo de que el sujeto está padeciendo una infección provocada no sólo por *M. avium* sino también provocada por cualquier NTM.

La quinta realización de la presente invención, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas, se refiere a un método *in vitro* para diferenciar entre infecciones provocadas no sólo por *M. avium* sino también provocadas por cualquier NTM, a partir de una infección por tuberculosis latente, comprendiendo dicho método: a) incubar una muestra biológica obtenida del sujeto con cualquiera de los antígenos mencionados en cualquiera de las realizaciones uno a tres anteriores, es decir, antígenos GLP no específicos de serovar de *M. avium* de fórmula (I), b) cuantificar el nivel secretado de al menos una citocina, c) en el que si el nivel de citocina cuantificado en la etapa (b) es mayor que el nivel de control de referencia, es indicativo de que el sujeto está padeciendo una infección provocada no sólo por *M. avium* sino también provocada por cualquier NTM, y puede descartarse una infección por tuberculosis latente cuando la prueba IGRA convencional es negativa.

La sexta realización de la presente invención, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas, se refiere a un método *in vitro* para decidir si administrar un tratamiento médico a un sujeto que se sospecha que padece una infección provocada no sólo por *M. avium* sino también provocada por cualquier NTM, comprendiendo dicho método: a) incubar una muestra biológica obtenida del sujeto con cualquiera de los antígenos mencionados en cualquiera de las realizaciones uno a tres anteriores, es decir, antígenos GLP no específicos de serovar de *M. avium* de fórmula (I), b) cuantificar el nivel secretado de al menos una citocina y c) en el que si el nivel de citocina cuantificado en la etapa (b) es mayor que el nivel de control de referencia, es indicativo de que el sujeto está padeciendo una infección provocada no sólo por *M. avium* sino también provocada por cualquier NTM, y podría aplicarse un tratamiento

médico dirigido a NTM.

En una realización preferida, la infección por NTM se identifica en sujetos que padecen: linfadenitis, infección de la piel y partes blandas, enfermedades pulmonares crónicas, enfermedad diseminada en pacientes inmunodeprimidos.

Se divulga, pero no forma parte de la invención, el aspecto de que la infección por NTM está provocada por una micobacteria seleccionada del grupo que comprende: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium farcinogenes*, *Mycobacterium lepraemurium*, *Mycobacterium porcinum* y *Mycobacterium senegalense*, entre otras. Más particularmente, por cualquiera de las siguientes bacterias seleccionadas del grupo que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium xenopi* o *Mycobacterium smegmatis*. En particular, tales nsGPL son capaces de detectar infecciones provocadas por cualquiera de las siguientes especies bacterianas seleccionadas de la lista que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium farcinogenes*, *Mycobacterium habana*, *Mycobacterium hominis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium porcinum*, *Mycobacterium senegalense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium scrofulaceum* y *Mycobacterium simiae*; todavía más particularmente por cualquiera de las siguientes especies bacterianas seleccionadas de la lista que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium xenopi*.

En una realización preferida, la citocina o combinación de citocinas se seleccionan del grupo que comprende: IFN- γ , TNF- α , IP-10, IL-10, IL-1RA, GM-CSF, IL-13, IL-17, IL-5, IL-2, IL-22 e IL-32.

En una realización preferida, la muestra biológica se selecciona de: sangre completa, saliva, líquido broncoalveolar, líquido cefalorraquídeo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) purificadas o biopsias.

El sujeto es un humano o un animal. Por otro lado, los métodos usados para cuantificar la secreción de citocinas en una muestra biológica se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, cualquier método inmunológico, tal como, pero sin limitarse a, ELISA, estrategias múltiples, ELISPOT, técnicas de inmunocromatografía, métodos proteómicos, inmunotransferencia de tipo Western, FACS o radioinmunoensayos, puede ser aplicable a la presente invención. Normalmente, dichos métodos comprenden poner en contacto la muestra biológica con una pareja de unión capaz de interaccionar selectivamente con los biomarcadores presentes en la muestra biológica. La pareja de unión puede ser un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferiblemente monoclonal. En otra realización, la pareja de unión puede ser un aptámero. Los anticuerpos policlonales o un fragmento de los mismos pueden crearse según métodos conocidos mediante la administración del antígeno o epítipo apropiado a un animal huésped seleccionado, por ejemplo, de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Pueden usarse diversos adyuvantes conocidos en la técnica para aumentar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales o un fragmento de los mismos pueden prepararse y aislarse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma originalmente descrita por Kohler y Milstein (1975); la técnica del hibridoma de células B humanas (Cote *et al.*, 1983); y la técnica del hibridoma del VEB (Cole *et al.* 1985). Alternativamente, pueden adaptarse las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.946.778) para producir anticuerpos de cadena sencilla anti-citocinas. Los anticuerpos útiles en la práctica de la presente invención también incluyen fragmentos anti-citocinas, incluyendo, pero sin limitarse a, fragmentos F(ab')₂, que pueden generarse mediante la digestión con pepsina de una molécula intacta de anticuerpo, y fragmentos Fab, que pueden generarse mediante la reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir la rápida identificación de fragmentos que tienen la especificidad deseada para una citocina. Por ejemplo, puede usarse visualización en fagos de anticuerpos. En un método de este tipo, se expresan fragmentos de cadena sencilla Fv (scFv) o Fab en la superficie de un bacteriófago adecuado, por ejemplo, M13. Brevemente, se retiran esplenocitos de un huésped adecuado, por ejemplo, ratón, que se ha inmunizado con una proteína. Las regiones codificantes de las cadenas VL y VH se obtienen a partir de esas células que están produciendo el anticuerpo deseado contra la proteína. Luego se fusionan estas regiones codificantes con un extremo terminal de una secuencia de fago. Una vez insertado el fago en un portador adecuado, por ejemplo, bacterias, el fago presenta el fragmento de anticuerpo. La presentación en fagos de anticuerpos también puede proporcionarse mediante métodos combinatorios conocidos por los expertos en la técnica. Los fragmentos de anticuerpo presentados por un fago pueden usarse entonces como parte de un inmunoensayo. En otra realización, la pareja de unión puede ser un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en cuanto a reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias oligonucleotídicas u oligopeptídicas con la capacidad para reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos pueden aislarse a través de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento

exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias al azar, tal como se describe en Tuerk C. 1997. La biblioteca de secuencias al azar puede obtenerse mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado de manera química, de una secuencia única. Las modificaciones, los usos y las ventajas posibles de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en regiones variables de anticuerpos conformacionalmente limitadas presentadas mediante una proteína plataforma, tal como tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan de bibliotecas combinatorias mediante dos métodos híbridos (Colas *et al.*, 1996). Las parejas de unión tales como anticuerpos o aptámeros pueden marcarse con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otro marcador conocido en la técnica. En la técnica se conocen marcadores que generalmente proporcionan (o bien directa o bien indirectamente) una señal. Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "marcado", con respecto al anticuerpo, abarque el marcaje directo del anticuerpo o aptámero mediante el acoplamiento (es decir, la unión física) de una sustancia detectable, tal como un agente radiactivo o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)) al anticuerpo o aptámero, así como el marcaje indirecto de la sonda o el anticuerpo mediante reactividad con una sustancia detectable. Un anticuerpo o aptámero puede marcarse con una molécula radiactiva mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las moléculas radiactivas incluyen, pero no se limitan a, átomos radiactivos para estudios gammagráficos tales como I123, I124, In111, Re186, Re188. Los ensayos anteriormente mencionados generalmente implican la unión de la pareja de unión (es decir, el anticuerpo o aptámero) a un soporte sólido. Los soportes sólidos que pueden usarse en la práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pocillo de microtitulación); poli(cloruro de vinilo) (por ejemplo, láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o pocillos de microtitulación); poli(fluoruro de vinilideno); papel diazotizado; membranas de nailon; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles, plástico o vidrio (por ejemplo, tubos de recogida de sangre). En una realización particular, puede usarse un método de ELISA, en el que se recubren los pocillos de una placa de microtitulación con un conjunto de anticuerpos que reconocen dicha(s) citocina(s). Luego se añade una muestra biológica que contiene o que se sospecha que contiene dicha(s) citocina(s) a los pocillos recubiertos. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, la(s) placa(s) puede(n) lavarse para retirar restos no unidos y puede añadirse una molécula de unión secundaria marcada de manera detectable. Se permite que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora de muestra capturada, se lava la placa y se detecta la presencia de la molécula de unión secundaria usando métodos bien conocidos en la técnica. En una realización, puede usarse un método de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de puntos (ELISpot). Para la detección mediante el método de ELISpot, la muestra biológica se envía al laboratorio y luego en el laboratorio se aíslan las PBMC y se incuban con los antígenos. Normalmente, la muestra biológica se transfiere a una placa que se ha recubierto con los anticuerpos de captura anti-citocinas deseados. La revelación se lleva a cabo con Ac secundarios biotinilados y métodos de detección colorimétricos o fluorométricos convencionales, tales como estreptavidina-fosfatasa alcalina y NBT-BCIP, y se cuentan los puntos. En una realización, cuando se requiere la cuantificación de la secreción de múltiples citocinas, puede preferirse el uso de perlas que portan las parejas de unión de interés. En una realización particular, la perla puede ser una perla citométrica para su uso en citometría de flujo. Tales perlas pueden corresponder, por ejemplo, a perlas citométricas BD™ comercializadas por BD Biosciences (San José, California). Normalmente, las perlas citométricas pueden ser adecuadas para preparar un ensayo de perlas multiplexado. Un ensayo de perlas multiplexado, tal como, por ejemplo, la matriz de perlas citométricas BD™, es una serie de perlas espectralmente discretas que pueden usarse para capturar y cuantificar antígenos solubles. Normalmente, las perlas se marcan con uno o más colorantes fluorescentes espectralmente distintos, y la detección se lleva a cabo usando una multiplicidad de fotodetectores, uno para cada colorante distinto que va a detectarse. En la bibliografía se han descrito varios métodos de preparación y uso de conjuntos de perlas distinguibles. Estos incluyen perlas distinguibles por tamaño, en los que la perla de cada tamaño se recubre con un anticuerpo específico de diana diferente (véase, por ejemplo, Fulwiler y McHugh, 1990, *Methods in Cell Biology* 33:613-629), perlas con dos o más colorantes fluorescentes en concentraciones variables, en los que las perlas se identifican por los niveles de colorantes fluorescentes (véase, por ejemplo, la patente europea n.º 0 126.450) y perlas distinguiblemente marcadas con dos colorantes diferentes, en los que las perlas se identifican mediante la medición por separado de la intensidad de fluorescencia de cada uno de los colorantes (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.499.052 y 4.717.655). Hay disponibles comercialmente matrices tanto unidimensionales como bidimensionales para el análisis simultáneo de múltiples antígenos mediante citometría de flujo. Los ejemplos de matrices unidimensionales de perlas individualmente teñidas distinguibles por el nivel de intensidad de fluorescencia incluyen la matriz de perlas citométricas BD™ (CBA) (BD Biosciences, San José, Calif.) y microesferas de citometría de flujo Cyto-Plex™ (Duke Scientific, Palo Alto, Calif.). Un ejemplo de una matriz bidimensional de perlas distinguibles por una combinación de intensidad de fluorescencia (cinco niveles) y tamaño (dos tamaños) son las microesferas QuantumPlex(TM) (Bangs Laboratories, Fisher, Ind.). Un ejemplo de una matriz bidimensional de perlas doblemente teñidas distinguibles por los niveles de fluorescencia de cada uno de los dos colorantes se describe en Fulton *et al.* (1997, *Clinical Chemistry* 43(9):1749-1756). Las perlas pueden marcarse con cualquier compuesto fluorescente conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, FITC (FL1), PE (FL2), fluoróforos para su uso en el láser azul (por ejemplo, PerCP, PE-Cy7, PE-Cy5, FL3 y APC o Cy5, FL4), fluoróforos para su uso en el láser rojo, violeta o UV (por ejemplo, azul pacífico, naranja pacífico). En otra realización particular, la perla es una perla magnética para su uso en separación magnética. Las perlas magnéticas son conocidas por los expertos en la técnica. Normalmente, la perla magnética está fabricada preferiblemente de un material magnético seleccionado del grupo que consiste en metales (por ejemplo, hierro, cobalto y níquel), una aleación de los mismos y un óxido de los

misimos. En otra realización particular, la perla es una perla que está teñida y magnetizada.

En una realización, para la versión en tubo de la tecnología, la incubación de la muestra biológica con los antígenos de micobacterias se realiza en ubicaciones de diagnóstico inmediato tales como consultorios médicos, clínicas o instalaciones ambulatorias. Una vez completada la incubación, deja de existir el requisito de células recientes y activas. Las citocinas son estables y, por tanto, la muestra biológica puede almacenarse, congelarse o enviarse sin condiciones especiales. Por consiguiente, en una realización, la muestra biológica se recoge en un recipiente adecuado (por ejemplo, tubo de recogida) que contiene el antígeno de micobacterias o una pluralidad de antígenos de micobacterias. La etapa de incubación puede ser de desde 5 hasta 48 horas, más preferiblemente desde 5 hasta 36 horas e incluso más preferiblemente desde 12 hasta 24 horas, o un periodo de tiempo entre los mismos. Por tanto, en una realización, el tiempo de incubación es de 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 13 horas, 14 horas, 15 horas, 16 horas, 17 horas, 18 horas, 19 horas, 20 horas, 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas, 26 horas, 30 horas, 36 horas, 42 horas o 48 horas.

Aunque, tal como se demuestra en los ejemplos, los inventores han sido capaces de identificar no sólo infecciones provocadas por *M. avium* sino también infecciones provocadas por cualquier NTM usando precisamente antígenos nsGPL de *M. avium*, en el presente documento cabe destacar nuevamente que los presente ejemplos también ofrecen evidencias científicas que demuestran que el uso de otros nsGPL diferentes pertenecientes a NTM diferentes podría usarse para detectar infecciones provocadas por cualquier NTM. De hecho, el ejemplo 6 y el ejemplo 8 ofrecen evidencias claras de que también pueden usarse antígenos nsGPL de *M. smegmatis* para identificar no sólo infecciones provocadas por *M. smegmatis* sino también infecciones provocadas por cualquier NTM.

Para el propósito de la presente invención:

- El término “antígenos nsGPL de *M. avium*” se refiere a GPL presentes en la pared celular en la que no está presente la porción de oligosacáridos que define las diferentes serovar de las diferentes especies de NTM. En una realización preferida, los “nsGPL de *M. avium*” comprenden la fórmula I.
- Se pretende que el término “que comprende” incluya, pero sin limitarse a, lo que sigue a la expresión “que comprende”. Por tanto, el uso del término “que comprende” indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no.
- Por “que consiste en” quiere decirse que incluye, y se limita a, lo que sigue la expresión “que consiste en”. Por tanto, la expresión “que consiste en” indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos.
- El término “nivel de control de referencia”, cuando se hace referencia al nivel de los biomarcadores (citocinas) descritos en la presente invención, se refiere al nivel observado en pacientes que no están infectados con NTM. Es probable que el paciente se infecte con NTM con una sensibilidad y una especificidad dadas si los niveles del biomarcador (citocinas) en el paciente están por encima de dicho “nivel de control de referencia”. Un valor “de referencia” puede ser un valor de umbral o un valor de corte. Normalmente, un “valor de umbral” o “valor de corte” puede determinarse de manera experimental, empírica o teórica. Un valor de umbral también puede seleccionarse arbitrariamente basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, tal como reconocería un experto habitual en la técnica. El valor de umbral debe determinarse con el fin de obtener la sensibilidad y especificidad óptimas según la función de la prueba y la relación beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de falsos positivos y falsos negativos). Preferiblemente, el experto en la técnica puede comparar los niveles (o las puntuaciones) de secreción de citocinas obtenidos según el método de la invención con un valor de umbral definido. El valor de umbral puede derivarse del nivel (o la puntuación) de secreción de citocinas determinado en una muestra de control derivada de uno o más sujetos que están sustancialmente sanos (es decir, que no tienen NTM). El valor de umbral también puede derivarse del nivel (o la puntuación) de secreción de citocinas determinado en una muestra de control derivada de uno o más sujetos que padecen NTM. Además, puede usarse medición retrospectiva de los niveles (o las puntuaciones) de secreción de citocinas en muestras de sujeto históricas depositadas en banco de manera apropiada para establecer estos valores de umbral. Normalmente, la sensibilidad y especificidad óptimas (y, por tanto, el valor de umbral) pueden determinarse usando una curva característica operativa del receptor (ROC) basándose en los datos experimentales. Por ejemplo, después de determinar los niveles de las citocinas en un grupo de referencia, puede usarse análisis algorítmico para el tratamiento estadístico de las concentraciones medidas de biomarcadores en las muestras biológicas que van a someterse a prueba y, por tanto, obtener un patrón de clasificación que tiene significación para la clasificación de muestras. El nombre completo de la curva ROC es curva característica operativa del receptor, que también se conocen como curva característica de operación del receptor. Se usa principalmente para pruebas diagnósticas bioquímicas clínicas. La curva ROC es un indicador exhaustivo que refleja las variables continuas de la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) y la tasa de falsos positivos (1-especificidad). Revela la relación entre sensibilidad y especificidad con el método

de composición de imágenes. Una serie de diferentes valores de corte (umbrales o valores críticos, valores límite entre resultados normales y anómalos de la prueba de diagnóstico) se establecen como variables continuas para calcular una serie de valores de sensibilidad y especificidad. Luego se usa la sensibilidad como coordenada vertical y se usa la especificidad como coordenada horizontal para dibujar una curva. Cuando mayor es el área bajo la curva (AUC), mayor es la precisión de diagnóstico. En la curva ROC, el punto más cercano al extremo superior izquierdo del diagrama de coordenadas es un punto crítico que tiene tanto valores altos de sensibilidad como valores altos de especificidad. El valor de AUC de la curva ROC es de entre 1,0 y 0,5. Cuando $AUC > 0,5$, el resultado del diagnóstico mejora cada vez más a medida que la AUC se aproxima a 1. Cuando la AUC es de entre 0,5 y 0,7, la precisión es baja. Cuando la AUC es de entre 0,7 y 0,9, la precisión es moderada. Cuando la AUC es mayor de 0,9, la precisión es bastante alta. Este método algorítmico se realiza preferiblemente con un ordenador. Pueden usarse software o sistemas existentes en la técnica para dibujar la curva ROC, tales como: software estadístico médico MedCalc 9.2.0.1, SPSS 9.0.

- El término “resultado positivo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la situación cuando los niveles del biomarcador (citocinas) medidos en la muestra biológica obtenida del paciente son superiores al “nivel de control de referencia”. En este caso, es probable que el paciente esté infectado con especies de NTM.
- El término “resultado negativo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la situación cuando los niveles del biomarcador (citocinas) medidos en la muestra biológica obtenida del paciente son iguales o inferiores al “nivel de control de referencia”. En este caso, es probable que el paciente no esté infectado con especies de NTM.
- El término “muestra biológica”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a sangre completa, saliva, líquidos broncoalveolares, líquidos cefalorraquídeos o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) purificadas, o cualquiera de otros líquidos biológicos o tejidos, siempre que contengan leucocitos, y especialmente células T. Los líquidos biológicos se han aislado del sujeto y recogido en tubos u otros recipientes que contienen un anticoagulante apropiado cuando se requiera (por ejemplo, heparina de litio o citrato de sodio). Por ejemplo, la muestra de sangre completa en bruto es sangre completa no fraccionada recogida con un anticoagulante apropiado (por ejemplo EDTA, heparina o citrato de sodio). Contiene plasma y células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos). Puede ser una muestra de sangre recién aislada (<32 h) o una muestra de sangre que se ha obtenido previamente y se mantiene congelada hasta su uso. Puede añadirse el reactivo T-Cell *Xtend* (Oxford Immunotec, Abingdon, R. U.) en muestras de sangre procesadas >32 h tras la venopunción. T-Cell *Xtend* garantiza la funcionalidad de las células T cuando la sangre completa se almacena durante la noche. Normalmente, la muestra biológica (por ejemplo, muestra de sangre) comprende PBMC, incluyendo células T tales como células T CD4, células T CD8, células B, células T gamma-delta, pero también monocitos, macrófagos y células NK.
- El término “isómero” se refiere a una molécula con la misma fórmula molecular que cualquiera de los compuestos derivados de la fórmula I, pero con una estructura química diferente. Los isómeros contienen el mismo número de átomos de cada elemento, pero tienen disposiciones diferentes de sus átomos. Esto incluye los dos tipos principales de isómeros: isomerismo estructural (que incluye moléculas con la misma fórmula molecular que tienen patrones de unión y una organización atómica diferentes) y estereoisomerismo (que incluye moléculas con la misma fórmula molecular y secuencia de átomos unidos, pero difieren en las orientaciones tridimensionales de sus átomos en el espacio).

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Esquema del protocolo seguido en el método de la invención. Este protocolo se basa en la estimulación con antígeno de las muestras biológicas y la detección de citocinas mediante ELISPOT. Sin embargo, también funciona cuando los antígenos se fijan directamente en los tubos de recogida de sangre (tecnología en tubo), y la detección de citocinas se realiza mediante ELISA.

Figura 2. Gráfico con las células formadoras de puntos (SFC) obtenidas después de la estimulación con 4 GPL específicos de serovar (ss4GPL; puntos negros) y GPL no específicos (nsGPL; puntos grises) de *M. avium* por grupo de pacientes y usando la tecnología de ELISPOT. El número total de pacientes analizados mediante ss4GPL y nsGPL fueron n=109 y n=63, respectivamente. Los símbolos abiertos representan pacientes con fibrosis quística. Se excluyeron los resultados indeterminados. La línea punteada representa el corte de positividad (SCF=6). Los nsGPL en la figura se refieren a ns4GPL de *M. avium*.

Figura 3. Gráfico que muestra la liberación de IFN-gamma (UI/ml) por grupo de pacientes usando la tecnología de estimulación en tubo. La sangre completa se estimuló con dos concentraciones diferentes usando 5 µg (puntos negros; n=11) y 10 µg (puntos grises; n=14) de nsGPL de *M. avium*. Se excluyeron los resultados indeterminados. La línea punteada representa el corte de positividad (UI/ml=0,6).

Figura 4. Esquema que muestra la estructura química del núcleo lipopeptídico, nsGPL, y diferentes GPL específicos de serovar en *M. avium*. La porción de oligosacárido define las diferentes serovar.

Figura 5. GPL no específicos (nsGPL) de *M. avium* y *M. smegmatis*. Estos GPL comparten el mismo núcleo de tripéptido-amino-alcohol de acilo graso unido a N diglicosilado. Sin embargo, existen ligeras diferencias en la modificación de la α -l-ramnosa (ramnosa) y 6-desoxi- α -l-talosa (6-desoxitalosa). En el caso de *M. avium*, la ramnosa o bien está 3-O-metilada o bien está 3,4-di-O-metilada, y la 6-desoxitalosa está 3-O-metilada o no metilada. En el caso de *M. smegmatis*, sus nsGPL contienen una 3,4-di-O-metil-ramnosa o una 2,3,4-tri-O-metil-ramnosa, y la 6-desoxitalosa habitualmente está 3,4-di-O-acetilada. Las cepas de MAC también pueden tener grupos acetilo en diversas ubicaciones indefinidas en el GPL en función de la cepa de micobacterias.

Figura 6. Las cepas de MAC producen GPL específicos de serovar (ssGPL) polares. Los ssGPL contienen una α -l-ramnosa que siempre está 3,4-di-O-metilada, y la 6-desoxi- α -l-talosa no metilada se extiende con restos de hidrato de carbono adicionales. Los diferentes ssGPL presentan diferentes anexos de oligosacáridos. Por ejemplo, el GPL serovar 1 contiene una α -l-ramnosa-(1 $\rightarrow$ 2)-6-desoxi- α -l-talosa unida a la *alo*-treonina del núcleo lipopeptídico, y el GPL serovar 2 contiene una 2,3-di-O-metil- α -l-fucosa-(1 $\rightarrow$ 3) unida a la ramnosa del GPL serovar 1.

Figura 7. Gráfico que muestra las células formadoras de puntos (SFC) obtenidas después de la estimulación con GPL no específicos (ns4GPL) de *M. avium* usando la tecnología de ELISPOT en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas con aislamiento de NTM; y clasificadas como: (i) colonizados, (ii) infectados o (iii) con infección previa. Se excluyeron los resultados indeterminados. La línea punteada representa el corte de positividad (SCF=6). **p<0,001.

Figura 8. Gráfico que compara las células formadoras de puntos (SFC) obtenidas en la población general después de la estimulación con ss4GPL y ns4GPL. No hubo diferencias significativas entre las SFC cuando se estimularon con cualquiera de los dos antígenos GPL (p>0,05).

Descripción detallada de la invención

La presente invención también se ilustra mediante los ejemplos mostrados a continuación. No deben interpretarse como una limitación del alcance de la invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Glosario de términos

- nsGPL: glicopeptidolípido no específico de serovar
- ssGPL: glicopeptidolípido específico de serovar
- ss4GPL: 4 glicopeptidolípidos específicos de serovar de *M. avium*
- ns4: GPL no específico de serovar obtenido de un ss4GPL de la cepa *M. avium*
- ns8: GPL no específico de serovar obtenido de un ss8GPL de la cepa *M. avium*
- MAC: complejo de *Mycobacterium avium*
- MAI: *Mycobacterium avium-intracellulare*
- HC: controles sanos. Individuos con TST e IGRA negativos, sin adenopatías y radiografía normal
- LTBI: Individuos a los que se les ha diagnosticado infección por TB latente mediante TST e IGRA

Ejemplo 1. Método para obtener los nsGPL:

Procedimiento para obtener los GPL totales (nsGPL + ssGPL):

Se rascaron colonias de complejo de *M. avium* a partir de la superficie de placas de agar Middlebrook 7H11 que contenían enriquecimiento de ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa (OADC) y se transfirieron asépticamente a tubos de cultivo de vidrio estériles con tapa de rosca (20 x 120 mm) que contenían 5 ml de metanol (CH₃OH) seguido de la adición de 10 ml de cloroformo (CHCl₃) para una razón final de CHCl₃-CH₃OH (2:1 v/v), y se incubaron a 37 °C durante la noche. Después de este periodo de incubación, las muestras se centrifugaron durante 5 min a 11.500 x g a 4 °C para obtener sobrenadantes (extracciones orgánicas que contienen lípidos totales). Luego, los

lípidos totales se trataron con álcali suave (un mismo volumen de hidróxido de sodio (NaOH) 0,2 N en CH₃OH a 37 °C durante 35 min) seguido de neutralización usando 100 microlitros de ácido acético glacial (de 2 a 3 gotas, comprobando que el pH fuera de 7,0). La hidrólisis con álcali suave destruye los acilglicérols no específicos lábiles al álcali, por lo que sirve como etapa de purificación para los GPL resistentes al álcali. Los lípidos tratados con álcali se sometieron a reparto adicionalmente entre CHCl₃-CH₃OH (2:1 v/v) y H₂O a una razón de 1:1 (v/v) para retirar las sales de acetato de sodio generadas. Esta etapa de "lavado" se repitió dos veces. La fase de cloroformo final (fase inferior) que contiene la fracción de GPL totales se transfirió a un tubo previamente pesado y secado bajo nitrógeno para evitar la oxidación de los lípidos. Las muestras secadas se mantuvieron a -20 °C bajo nitrógeno hasta su uso posterior. Esto permite obtener los GPL totales (nsGPL + ssGPL).

Procedimiento para purificar los ssGPL a partir de los nsGPL:

Los extractos de GPL totales se procesaron adicionalmente. Se equiparon cartuchos de cuerpo largo SEPPAK Classic Silica (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.) con jeringas de vidrio de 5 ml, que actuaban como depósitos para los disolventes de elución. Los cartuchos SEPPAK se equilibraron con CHCl₃ (5 ml x 3 veces) seguido de la aplicación de los GPL totales disueltos en 0,5 ml de CHCl₃. Luego se irrigó el cartucho con 3 ml de CHCl₃ seguido de CH₃OH al 2, 10, 25, 35 y 50 % en CHCl₃. Finalmente, se lavó el cartucho varias veces con 5 ml de CH₃OH. Los nsGPL se retiraron con CHCl₃ y con CH₃OH al 2 % en CHCl₃. La población de ssGPL totales se recogió en el eluato de CH₃OH al 20-35 %. Las fracciones se examinaron para determinar la pureza mediante CCF en CHCl₃-CH₃OH-H₂O (60:35:8 v/v/v).

Para la retirada de las cadenas de acilo unidas a N a partir de los GPL, es necesario usar el método conocido como beta-eliminación:

Los nsGPL o ssGPL purificados (150 mg) se disolvieron en metanol acuoso al 50 % [usando agua destilada libre de pirógenos (1:1 v/v)] que contenía hidróxido de sodio (NaOH) 1 N y borohidruro de sodio (NaBH₄) 1 M (también conocido como tetrahidrobórato de sodio o tetrahidrobórato de sodio) y luego se calentaron a 60 °C durante 24 h, se neutralizaron con ácido acético y se evaporaron en un evaporador rotatorio antes de someterse a reparto en CHCl₃-CH₃OH-H₂O (8:4:3, v/v/v). La fase inferior (fase de CHCl₃) se lavó dos veces mediante la adición de ½ volúmenes de H₂O, se agitó en vórtex, y la mezcla resultante se centrifugó durante 5 min a 11.500 g (conservando y combinando todas las fases acuosas de cada lavado). La fase inferior final (fase de CHCl₃) (que contiene el beta-lípido resultante) se secó bajo nitrógeno para evitar la oxidación y se almacenó bajo nitrógeno a -20 °C hasta su uso posterior. Las fases superiores (fase acuosa) obtenidas de cada lavado se combinaron, se concentraron usando un dispositivo speed-ac y se desalaron usando Sephadex G-25 para obtener el oligosacárido reducido. Esta técnica destruye el péptido en aminoácidos individuales. Es difícil obtener únicamente el glicopéptido. En cambio, es posible purificar el lipopéptido.

Ejemplo 2. Metodología

Se extrae sangre de cada paciente en dos conjuntos de tubos: (i) tubos CPT (Becton Dickinson Diagnostics, Franklin Lakes, NJ) para el aislamiento posterior de PBMC y (ii) tubos de recogida de sangre en los que se han fijado previamente los antígenos (véase la figura 1).

El primer enfoque se basa en el ensayo de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de puntos (ELISPOT). Brevemente, las PBMC se estimulan con los antígenos seleccionados (ss4GPL y nsGPL), así como con controles positivos y de referencia, en una placa de pocillos recubiertos previamente. Después de una incubación durante la noche, la placa se lava y se desarrolla, y se mide la producción de IFN-gamma contando las células formadoras de puntos (SFC).

El segundo enfoque se basa en la estimulación de sangre completa en tubos de recogida de sangre en los que ya se han fijado los antígenos. Para este procedimiento, los antígenos usados son ss4GPL y nsGPL, así como un control de referencia y uno positivo. Después de una incubación durante la noche, se recoge el plasma y, después de eso, se detecta la producción de IFN-gamma y otras citocinas.

Ejemplo 3. Análisis de resultados para cada metodología

Cortes de positividad para el procedimiento de ELISPOT/ELISA en tubo

Con el fin de establecer cortes de positividad para las SFC, se realizó un análisis de la curva ROC. Como controles positivos se consideraron aquellos pacientes con un cultivo de NTM positivo y como controles de referencia (no infectados) aquellos individuos sin infección por NTM o LTBI. El corte de positividad se estableció en cinco SFC, que proporcionó la especificidad más alta (100 %) sin gran pérdida de sensibilidad (70,59 %). Sin embargo, basándose en la experiencia previa de los presentes inventores, se seleccionaron seis SFC como corte. Por tanto, los pocillos sometidos a prueba se consideran positivos si contienen al menos seis SFC más que el pocillo de control de referencia y si este número es al menos el doble que el número del pocillo de control negativo.

Con respecto a la detección de IFN-gamma en sangre completa mediante ELISA después de la estimulación en tubo, el corte se definió arbitrariamente como 0,6 UI/ml (figura 3).

Además, se considera que un resultado es indeterminado en los siguientes tres casos: (i) si la respuesta a los antígenos es negativa, (ii) si el número de SFC en el pocillo de control positivo es menor de 20 y (iii) si el número de SFC en el control de referencia es mayor de 10.

Ejemplo 4. Porcentaje de positivos obtenidos después de la estimulación con ss4GPL o nsGPL por grupo de pacientes usando la tecnología propia de ELISPOT.

Un total de 109 y 63 pacientes se estimularon con ss4GPL y nsGPL, respectivamente. Los pacientes se clasificaron en seis grupos diferentes: (i) controles sanos (individuos con TST e IGRA negativos, sin adenopatías y radiografía normal); (ii) cultivo positivo para NTM (pacientes con un cultivo de NTM confirmado); (iii) adenitis no confirmada por cultivo (pacientes con adenopatías y sin confirmación de NTM por cultivo/cultivo negativo); (iv) LTBI (individuos con TST e IGRA positivos, procedentes de estudios de rastreo de contactos o cribados de LTBI, sin adenopatías y radiografía normal); (v) TB activa (pacientes con confirmación de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR y/o cultivo); (vi) grupo de estudio (individuos no vacunados con BCG con TST positiva e IGRA negativo, procedentes de estudios de rastreo o cribados de LTBI, sin adenopatías y radiografía normal). Las PBMC se aislaron de cada individuo y se estimularon con ss4GPL y/o nsGPL. La presencia de células T sensibilizadas contra los antígenos se analizó por medio de un ELISPOT propio que detecta células formadoras de puntos que secretan IFN-gamma.

Tal como se muestra en la tabla 1, cualquier control sano mostró un resultado de ELISPOT positivo después de la estimulación con ambos antígenos. Cuando se analizaron los pacientes con un aislamiento de cultivo de NTM positivo, se obtuvieron un total del 76,9 % (20/26) y el 77,8 % (14/18) de resultados positivos después de la estimulación con ss4GPL y/o nsGPL, respectivamente. Para este grupo específico se detalla el tipo de micobacterias aisladas. Los pacientes con adenopatías no confirmadas por cultivo presentaron el 48,1 % (13/27) y el 77,8 % (7/9) de resultados positivos para ss4GPL y nsGPL. La respuesta a ss4GPL y nsGPL en individuos con LTBI fue del 8,7 % (2/23) y el 14,3 % (2/14), respectivamente. Dos pacientes con TB activa respondieron a ss4GPL (15,4 %; 2/13) y a nsGPL (13,3 %; 2/15). Además, el 70 % (7/10) y el 100 % (2/2) de los individuos procedentes del grupo de estudio tenían una respuesta positiva contra ss4GPL y nsGPL. Estos resultados reforzaron la hipótesis de que los niños sin BCG, que responden a TST y tienen un resultado de IGRA negativo, pueden sensibilizarse a las NTM. El número de células formadoras de puntos después de la estimulación con ambos antígenos se detalla en la figura 1 por grupo de pacientes.

Tabla 1. Porcentaje de positivos obtenidos después de la estimulación con ss4GPL o nsGPL de *M. avium* por grupo de pacientes. Para el grupo de cultivo positivo para NTM se detalla el tipo de micobacterias aisladas. Los resultados de nsGPL se refieren a ns4GPL.

GRUPO DE ESTUDIO	Positivos para ss4GPL, n (%)	Positivos para nsGPL, n (%)
Controles sanos	0/10 (0)	0/5 (0)
Cultivo positivo para NTM	20/26 (76,9)	14/18 (77,8)
<i>M. avium</i>	13/17 (76,5)*	9/12 (75)*
<i>M. malmoense</i>	2/3 (66,7)	-
<i>M. chimaera</i>	1/1 (100)	1/1 (100)
<i>M. abscessus</i>	2/2 (100)**	2/2 (100)**
<i>M. fortuitum</i>	0/1 (0)	0/1 (0)
<i>M. intracellulare</i>	1/2 (50)	1/2 (50)
Adenitis no confirmada por cultivo	13/27 (48,1)	7/9 (77,8)
LTBI	2/23 (8,7)	2/14 (14,3)
TB activa	2/13 (15,4)	2/15 (13,3)
Grupo de estudio de NTM	7/10 (70)	2/2 (100)

* Un paciente con fibrosis quística; ** Dos pacientes con fibrosis quística

Ejemplo 5. Porcentaje de positivos obtenidos después de la estimulación con nsGPL por grupo de pacientes usando la tecnología en tubo.

Un total de 14 pacientes se estimularon en tubo con 10 µg de nsGPL de *M. avium* (tabla 2). Los pacientes se clasificaron en tres grupos: (i) controles sanos (individuos con TST e IGRA negativos, sin adenopatías y radiografía normal); (ii) cultivo positivo para NTM (pacientes con un cultivo de NTM confirmado); (iii) adenitis no confirmada por cultivo (pacientes con adenopatías y sin confirmación de NTM por cultivo/cultivo negativo). La sangre completa se incubó directamente en tubo con los nsGPL. Se midió la cantidad de IFN-gamma liberado (UI/ml) mediante ELISA. El individuo sano sometido a prueba mediante esta tecnología presentó una respuesta negativa cuando se estimuló con nsGPL. Cuando se analizaron los pacientes con un aislamiento de cultivo de NTM positivo y adenopatías no

confirmadas por cultivo, se obtuvieron un total del 77,8 % (7/9) y el 50 % (2/4) de resultados positivos, respectivamente. La cantidad total de IFN-gamma liberado detallado por grupo de pacientes después de la estimulación con nsGPL se representa en la figura 2.

- 5 Tabla 2. Porcentaje de positivos por grupo de pacientes obtenidos después de la estimulación con nsGPL en tubo. Los resultados de nsGPL se refieren a ns4GPL.

GRUPO DE ESTUDIO	Positivos para GPL en tubo (10 µg), n (%)
Controles sanos (n=1)	0/1 (0)
Cultivo positivo para NTM (n=9)	7/9 (77,8)
Adenitis no confirmada por cultivo (n=4)	2/4 (50)

- 10 Ejemplo 6. Porcentaje de resultados positivos obtenidos después de la estimulación con nsGPL de *Mycobacterium smegmatis*.

Se sometieron a prueba un total de 22 pacientes para los nsGPL de *Mycobacterium smegmatis* mediante la tecnología propia de ELISPOT (tabla 3). Los pacientes se clasificaron en tres grupos: (i) controles sanos (individuos con TST e IGRA negativos, sin adenopatías y radiografía normal); (ii) pacientes a los que se les diagnosticó infección LTBI mediante TST e IGRA; (iii) cultivo positivo para NTM (pacientes con un cultivo de NTM confirmado); (iv) adenitis no confirmada por cultivo (pacientes con adenopatías y sin confirmación de NTM por cultivo/cultivo negativo). Ninguno de los pacientes pertenecientes al control sano o LTBI respondieron a este antígeno. Ocho de 12 del grupo de cultivo positivo para NTM respondieron a este antígeno (66,7 %); y sólo dos pacientes de 8 con adenopatías no confirmadas por cultivo tuvieron una respuesta positiva después de la estimulación con nsGPL de *M. smegmatis* (25 %; 2/8).

Tabla 3. Porcentaje de positivos obtenidos después de la estimulación con nsGPL de *Mycobacterium smegmatis* por grupo de pacientes. Para el grupo de cultivo positivo para NTM se detalla el tipo de micobacterias aisladas.

GRUPO DE ESTUDIO	Positivos para nsGPL de <i>M. smegmatis</i>
Controles sanos (n=1)	0 (0)
LTBI (n=1)	0 (0)
Cultivo positivo para NTM (n=12)	8 (66,7)
Complejo de <i>M. avium</i> (n=7)	3/7 (42,8)
<i>M. abscessus</i> + <i>M. avium</i> (n=2)	2/2 (100)
<i>M. chimaera</i> (n=3)	3/3 (100)
Adenitis no confirmada por cultivo (n=8)	2/8 (25)

Ejemplo 7. Estimulación con la fracción peptídica de nsGPL.

Con el fin de determinar si la fracción peptídica de nsGPL era inmunogénica por sí misma o no, los inventores de esta invención realizaron una serie de experimentos en los que las PBMC no sólo se estimularon con la molécula completa de ss4GPL y nsGPL, sino también con la fracción peptídica. El procedimiento seguido fue el mismo tal como se describe en el ejemplo 2 y se ilustra en la figura 1. La fracción peptídica (D-Phe-D-*α*-Thr-D-Ala-L-alanol) se sintetizó mediante JPT Innovative Peptide Solutions (JPT Peptide Technologies GmbH - Volmerstrasse 5 - 12489 Berlin). Un total de 10 pacientes (2 controles sanos y 8 pacientes con un cultivo de NTM confirmado) se sometieron a prueba mediante ELISPOT con la fracción peptídica de nsGPL. Tal como puede observarse en la tabla 4, ninguno de los pacientes incluidos respondió a los péptidos.

Tabla 4. Porcentaje de positivos obtenidos después de la estimulación con la fracción peptídica de nsGPL.

GRUPO DE ESTUDIO	Positivos para la fracción peptídica
Controles sanos (n=2)	0 (0)
Cultivo positivo para NTM (n=8)	0 (0)

Ejemplo 8. Porcentaje de resultados positivos obtenidos después de la estimulación con ss4GPL, ns4GPL, ns8GPL, lípidos totales y mezcla de ss4GPL y ns4GPL de *Mycobacterium avium* y nsGPL de *Mycobacterium smegmatis*.

Con el fin de determinar la inmunogenicidad de los lípidos totales, nsGPL obtenidos de diferentes serovar de *M. avium* o incluso de otras especies, los inventores de la presente invención realizaron una serie de experimentos en los que las PBMC se estimularon con la molécula completa de ss4GPL y nsGPL obtenidos de cepas ss4 y ss8 de *M. avium*, lípidos totales, una mezcla de ss4 y ns4 y nsGPL de *M. smegmatis*. Un total de 50 pacientes se sometieron a prueba para los antígenos mediante la tecnología propia de ELISPOT (tabla 5). Los pacientes se

clasificaron en tres grupos: (i) controles sanos (individuos con TST e IGRA negativos, sin adenopatías y radiografía normal); (ii) pacientes a los que se les ha diagnosticado infección LTBI mediante TST e IGRA; (iii) cultivo positivo para NTM (pacientes con un cultivo de NTM confirmado); (iv) adenitis no confirmada por cultivo (pacientes con adenopatías y sin confirmación de NTM por cultivo/cultivo negativo); (v) TB activa (pacientes con confirmación de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR y/o cultivo); (vi) grupo de estudio (individuos no vacunados con BCG con TST positiva e IGRA negativo, procedentes de estudios de rastreo de contactos o cribados de LTBI, sin adenopatías y radiografía normal).

Tal como se muestra a continuación, la inmunogenicidad de los antígenos sometidos a prueba era muy similar, sin mostrar diferencias significativas en la distribución de resultados positivos entre los diferentes grupos de pacientes sometidos a prueba (tablas 5 y 6). Dadas las diferencias no significativas entre los resultados detectados usando ss4GPL y ns4GPL de *Mycobacterium avium* (tablas 5 y 6, figura 8), los resultados obtenidos mediante cualquiera de estos dos GPL (ss4GPL o ns4GPL) se detallan en la tabla 7.

Tabla 5. Porcentaje de positivos obtenidos después de la estimulación con ss4GPL, ns4GPL, ns8GPL, lípidos totales y mezcla de ss4GPL y ns4GPL de *Mycobacterium avium* y nsGPL de *Mycobacterium smegmatis* por grupo de pacientes. Para el grupo de cultivo positivo para NTM se detalla el tipo de micobacterias aisladas.

Muestras sometidas a prueba (n=49)	Positivos (%)					
	ss4	ns4	ns8	Total	Mezcla ss4+ns4	<i>M. smeg</i>
Positivos para NTM (n=12)	7*** (58,3)	8** (66,7)	6 (50)	6** (50)	9**** (75)	6**** (60)
MAC (n=6)	3** (50)	4* (66,7)	2 (33,3)	3** (50)	3* (50)	3*** (50)
<i>M. abscessus</i> (n=1)	1* (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1* (100)
<i>M. chimaera</i> (n=1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>M. abscessus</i> + <i>M. chimaera-intracellulare</i> (n=1)	-	1* (100)	1 (100)	-	1* (100)	-
<i>M. avium</i> + <i>M. abscessus</i> (n=1)	1* (100)	-	-	-	1* (100)	-
MAI (2017 tratados) + <i>M. abscessus</i> (9/2018 no tratados) (n=1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>M. celatum</i> (n=1)	-	-	-	-	1* (100)	-
LTBI (n=15)	5* (33,3)	3 (20)	6** (40)	4* (26,7)	6* (40)	2 (13,3)
TB activa (n=6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	0 (0,0)
HC (n=9)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (11,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Linfadenopatías no confirmadas por cultivo (n=4)	1* (25,0)	1* (25,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	1* (25,0)	1* (25,0)
Grupo de estudio (n=3)	1 (33,3)	3 (100)	1 (33,3)	3 (100)	2 (66,7)	0 (0,0)

* El número de * indica el número de valores de límite positivos (6-7 SFC). Tabla 6. Porcentaje de positivos obtenidos después de la estimulación con ss4GPL y ns4GPL por grupo de pacientes. Para el grupo de cultivo positivo para NTM se detalla el tipo de micobacterias aisladas.

ss4GPL frente a nsGPL (n=181)			
		Positivos (%)	
		ss4GPL	ns4GPL
NTM+ (n=25) (4 CF)	MAC ^a (n=19)	13**** (68,4)	15*** (78,9)
	<i>M. chimaera</i> (n=1)	1 (100,0)	1 (100,0)
	MAC + <i>M. abscessus</i> ^b (n=4)	4* (100,0)	3 (75,0)
	<i>M. abscessus</i> + <i>M. chimaera</i> (n=1)	-	1* (100,0)
	ExNTM+ (n=6)	1* (16,7)	2** (33,3)
LTBI (n=42)		14* (33,3)	10** (23,8)
TB activa (n=29)		4 (13,8)	4* (13,8)
HC (n=13)		0 (0,0)	0 (0,0)
Linfadenopatías no confirmadas por cultivo (n=8)		3* (37,5)	3* (37,5)
Linfadenopatías sin NTM (n=1)		1 (100,0)	1 (100,0)
Grupo de estudio (3 de ellos con LTBI clínica) (n=5)		4 (80,0)	5 (100,0)
VIH (n=52)		14***** (26,9)	12*** (23,1)

^a *M. avium*, *M. intracellulare*, MAI, complejo de *M. avium*. ^b 2 de ellos FQ. * El número de * indica el número de resultados positivos con un valor de límite.

Tabla 7. Porcentaje de positivos obtenidos después de la estimulación con cualquier GPL de *Mycobacterium avium*

(ss4GPL o ns4GPL) por grupo de pacientes. Para el grupo de cultivo positivo para NTM se detalla el tipo de micobacterias aisladas.

GPL (n=338)		Positivos (%)
NTM+ (n=56) (4 CF)		41***** (73,2)
	MAC ^a (n=34) (1 ind.)	28***** (82,3)
	<i>M. fortuitum</i> (n=3)	0 (0,0)
	<i>M. chimaera</i> (n=4)	4 (100,0)
	<i>M. abscessus</i> (n=2) (1 ind. = exNTM))	1 (50,0)
	<i>M. xenopi</i> ^b (n=2)	1 (50,0)
	<i>M. malmoense</i> (n=3)	2 (66,7)
	MAC + <i>M. abscessus</i> ^c (n=4)	3 (75,0)
	MAC + <i>M. chimaera</i> (n=1)	0 (0,0)
	<i>M. abscessus</i> + <i>M. chimaera</i> (n=1)	1* (100,0)
	<i>M. abscessus</i> + <i>M. tuberculosis</i> (n=1)	0 (0,0)
	MAC + <i>M. kansasii</i> ^c (n=1)	1* (100,0)
LTBI (n=90) (2 indeterminados)		24***** (26,7)
TB activa (n=69) (1 indeterminado)		12*** (17,4)
HC (n=22)		0 (0,0)
Linfadenopatías no confirmadas por cultivo (n=32)		12* (37,5)
Linfadenopatías sin NTM (n=3)		0 (0,0)
Grupo de estudio (n=13) (3 de ellos con LTBI clínica)		10 (76,9)
VIH (n=53) (3 indeterminados)		12*** (22,6)

^a *M. avium*, *M. intracellulare*, MAI, complejo de *M. avium*. ^b Uno con TB activa. ^c 2 de ellos FQ. * El número de * indica el número de resultados positivos con un valor de límite.

Ejemplo 9. Plausibilidad de que las evidencias presentadas en el ejemplo 8 abarcan especies bacterianas de NTM adicionales.

1. *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium smegmatis*.

Estas dos especies de NTM tienen similitudes con la estructura de nsGPL de *M. avium* (Schorey JS y Sweet L. The mycobacteria glycopeptidolipids: structure, function and their role in pathogenesis. Glycobiology 2008, 18:832-841; y Chatterjee D y Khoo KH. The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. Cellular and Molecular Life Sciences 2001, 58: 2018-2042). Además, estas dos especies de NTM tienen la misma estructura de nsGPL que *M. xenopi* y *M. abscessus*, que ambas se detectan experimentalmente tal como se demuestra en el ejemplo 8. Por tanto, se considera plausible que estas dos especies de NTM puedan detectarse mediante la presente prueba.

2. *Mycobacterium farcinogenes*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium porcinum* y *Mycobacterium senegalense*.

Estas cuatro especies de NTM tienen similitudes con la estructura de nsGPL de *M. avium* (Schorey JS y Sweet L. The mycobacteria glycopeptidolipids: structure, function and their role in pathogenesis. Glycobiology 2008, 18:832-841; y Chatterjee D y Khoo KH. The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. Cellular and Molecular Life Sciences 2001, 58: 2018-2042). Además, estas cuatro especies de NTM tienen la misma estructura de nsGPL que *M. fortuitum*, que se detecta experimentalmente tal como se muestra en el ejemplo 8. Por tanto, se considera plausible que estas cuatro especies de NTM puedan detectarse mediante la presente prueba.

3. *Mycobacterium hominis*, *Mycobacterium paratuberculosis* y *Mycobacterium scrofulaceum*.

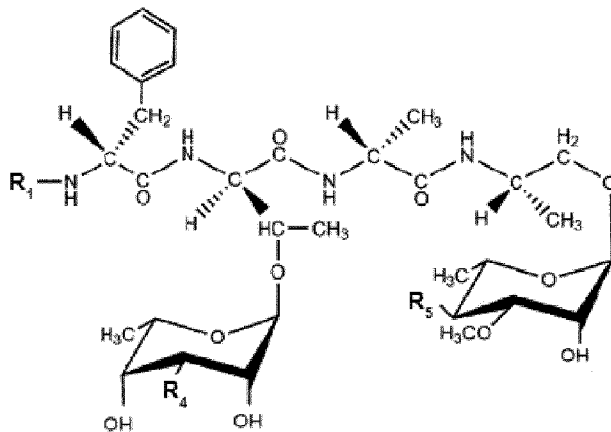
M. hominis y *M. paratuberculosis* son miembros del complejo de *M. avium*. Hasta hace poco, *M. scrofulaceum* también se consideraba un miembro del complejo de *M. avium*. *M. avium* y *M. intracellulare* (también miembros del complejo de *M. avium*) se detectan fácilmente tal como se muestra en el ejemplo 8. Por tanto, se considera plausible que estas tres especies de NTM puedan detectarse tal como se define en las reivindicaciones.

4. *Mycobacterium habana* y *Mycobacterium simiae*

Los nsGPL de estas dos especies de NTM son idénticos a la estructura de nsGPL de *M. avium* (2). Por tanto, se considera plausible que estas dos especies de NTM puedan detectarse mediante la presente prueba.

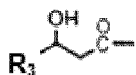
REIVINDICACIONES

1. Uso de antígeno GPL no específico de serovar de *Mycobacterium avium* (glicopeptidolípido no serovar, nsGPL) de fórmula (I)



(I)

en la que R₁ es



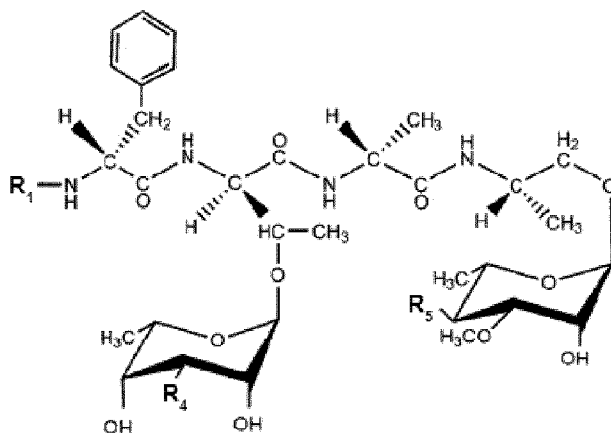
en la que R₃ es una cadena de alquilo o alquénilo que tiene desde 1 hasta 34 átomos de carbono;

en la que R₄ es -OH u -OCH₃; y

en la que R₅ es -OH u -OCH₃;

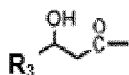
para el diagnóstico o la detección *in vitro* de infecciones provocadas no sólo por *Mycobacterium avium* sino también provocadas por cualquier micobacteria no tuberculosa seleccionada del grupo que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium xenopi*.

2. Uso de antígeno GPL no específico de serovar de *Mycobacterium avium* de fórmula (I)



(I)

en la que R₁ es



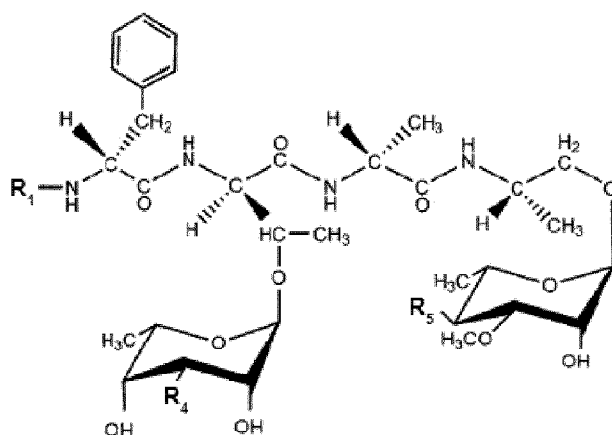
en la que R_3 es una cadena de alquilo o alqueniilo que tiene desde 1 hasta 34 átomos de carbono;

en la que R_4 es $-\text{OH}$ u $-\text{OCH}_3$; y

en la que R_5 es $-\text{OH}$ u $-\text{OCH}_3$;

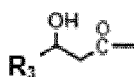
para la diferenciación *in vitro* entre infecciones provocadas no sólo por *Mycobacterium avium* sino también provocadas por cualquier micobacteria no tuberculosa seleccionada del grupo que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium xenopi*, a partir de infección por tuberculosis latente.

3. Uso de antígeno GPL no específico de serovar de *Mycobacterium avium* de fórmula (I)



(I)

en la que R_1 es



en la que R_3 es una cadena de alquilo o alqueniilo que tiene desde 1 hasta 34 átomos de carbono;

en la que R_4 es $-\text{OH}$ u $-\text{OCH}_3$; y

en la que R_5 es $-\text{OH}$ u $-\text{OCH}_3$;

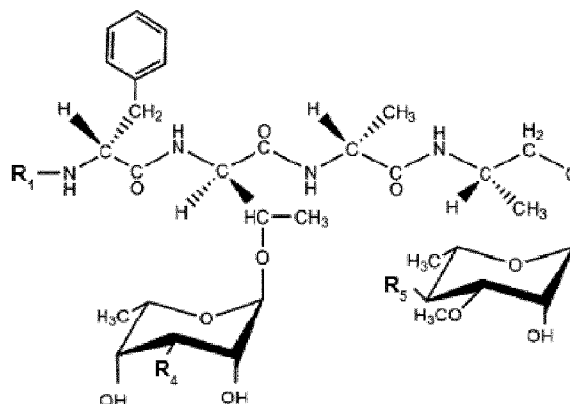
para decidir si administrar un tratamiento médico a un sujeto que se sospecha que padece una infección provocada no sólo por *Mycobacterium avium* sino también provocada por cualquier micobacteria no tuberculosa seleccionada del grupo que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium xenopi*.

4. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la infección por micobacterias no tuberculosas se identifica en sujetos que padecen: linfadenitis, infección de la piel y partes blandas, enfermedades pulmonares crónicas y enfermedad diseminada en pacientes inmunodeprimidos.

5. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que, en la fórmula I, R_3 es una cadena de alqueniilo que tiene 34 átomos de carbono, R_4 es $-\text{OCH}_3$ y R_5 es $-\text{OCH}_3$.

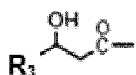
6. Método *in vitro* para detectar o diagnosticar infecciones provocadas no sólo por *Mycobacterium avium* sino también provocadas por cualquier micobacteria no tuberculosa seleccionada del grupo que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium xenopi*, comprendiendo dicho método:

a) incubar una muestra biológica, bajo la condición de que contenga leucocitos, obtenida del sujeto con antígeno GPL no específico de serovar de *Mycobacterium avium* de fórmula (I)



(I)

en la que R_1 es



en la que R_3 es una cadena de alquilo o alquienilo que tiene desde 1 hasta 34 átomos de carbono;

en la que R_4 es $-OH$ u $-OCH_3$; y

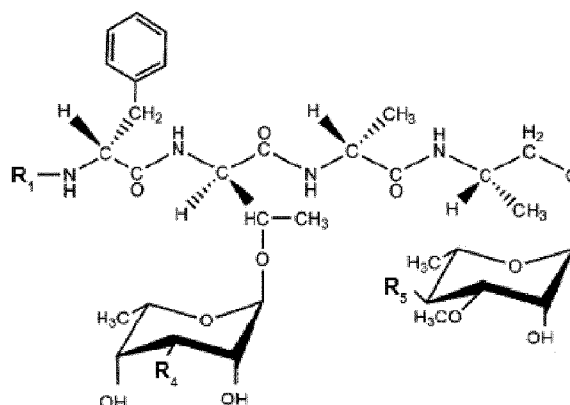
en la que R_5 es $-OH$ u $-OCH_3$;

b) cuantificar el nivel secretado de al menos una citocina,

c) en el que si el nivel de citocina cuantificado en la etapa (b) es mayor que el nivel de control de referencia, es indicativo de que el sujeto está padeciendo una infección provocada no sólo por *Mycobacterium avium* sino también provocada por cualquier micobacteria no tuberculosa seleccionada del grupo que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium mageritense* y *Mycobacterium xenopi*.

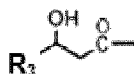
7. Método *in vitro* para diferenciar entre infecciones provocadas no sólo por *Mycobacterium avium* sino también provocadas por cualquier micobacteria no tuberculosa seleccionada del grupo que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium mageritense* y *Mycobacterium xenopi*, a partir de infección por tuberculosis latente, comprendiendo dicho método:

a) incubar una muestra biológica, bajo la condición de que contenga leucocitos, obtenida del sujeto con antígeno GPL no específico de serovar de *Mycobacterium avium* de fórmula (I)



(I)

en la que R_1 es



en la que R_3 es una cadena de alquilo o alqueniilo que tiene desde 1 hasta 34 átomos de carbono;

en la que R_4 es -OH u -OCH₃; y

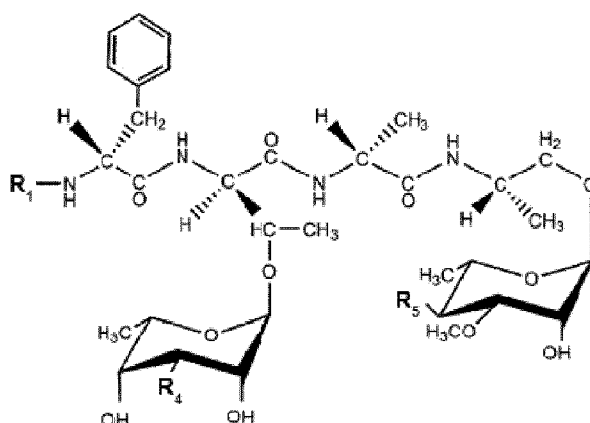
en la que R_5 es -OH u -OCH₃;

b) cuantificar el nivel secretado de al menos una citocina,

c) en el que si el nivel de citocina cuantificado en la etapa (b) es mayor que el nivel de control de referencia, es indicativo de que el sujeto está padeciendo una infección provocada no sólo por *Mycobacterium avium* sino también provocada por cualquier micobacteria no tuberculosa seleccionada del grupo que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoeense* y *Mycobacterium xenopi*, y puede descartarse una infección por tuberculosis latente cuando la prueba IGRA convencional es negativa.

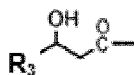
8. Método *in vitro* para decidir si administrar un tratamiento médico a un sujeto que se sospecha que padece una infección provocada no sólo por *Mycobacterium avium* sino también provocada por cualquier micobacteria no tuberculosa seleccionada del grupo que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoeense* y *Mycobacterium xenopi*, comprendiendo dicho método:

a) incubar una muestra biológica, bajo la condición de que contenga leucocitos, obtenida del sujeto con antígeno GPL no específico de serovar de *Mycobacterium avium* de fórmula (I)



(I)

en la que R_1 es



en la que R_3 es una cadena de alquilo o alqueniilo que tiene desde 1 hasta 34 átomos de carbono;

en la que R_4 es $-OH$ u $-OCH_3$; y

en la que R_5 es $-OH$ u $-OCH_3$;

b) cuantificar el nivel secretado de al menos una citocina, y

c) en el que si el nivel de citocina cuantificado en la etapa (b) es mayor que el nivel de control de referencia, es indicativo de que el sujeto está padeciendo una infección provocada no sólo por *Mycobacterium avium* sino también provocada por cualquier micobacteria no tuberculosa seleccionada del grupo que consiste en: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium xenopi*, y podría aplicarse un tratamiento médico dirigido a NTM.

9. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que la citocina o combinación de citocinas se seleccionan del grupo que comprende: IFN-gamma, TNF-alfa, IP-10, IL-10, IL-1RA, GM-CSF, IL-13, IL-17, IL-5, IL-2, IL-22 e IL-32.

10. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 19, en el que la infección por micobacterias no tuberculosas se identifica en sujetos que padecen: linfadenitis, infección de la piel y partes blandas, enfermedades pulmonares crónicas, enfermedad diseminada en pacientes inmunodeprimidos.

11. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en el que la muestra biológica se selecciona de: sangre completa, saliva, líquidos broncoalveolares, líquidos cefalorraquídeos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) purificadas o biopsias.

12. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en el que, en la fórmula I, R_3 es una cadena de alqueniilo que tiene 34 átomos de carbono, R_4 es $-OCH_3$ y R_5 es $-OCH_3$.

Figura 1

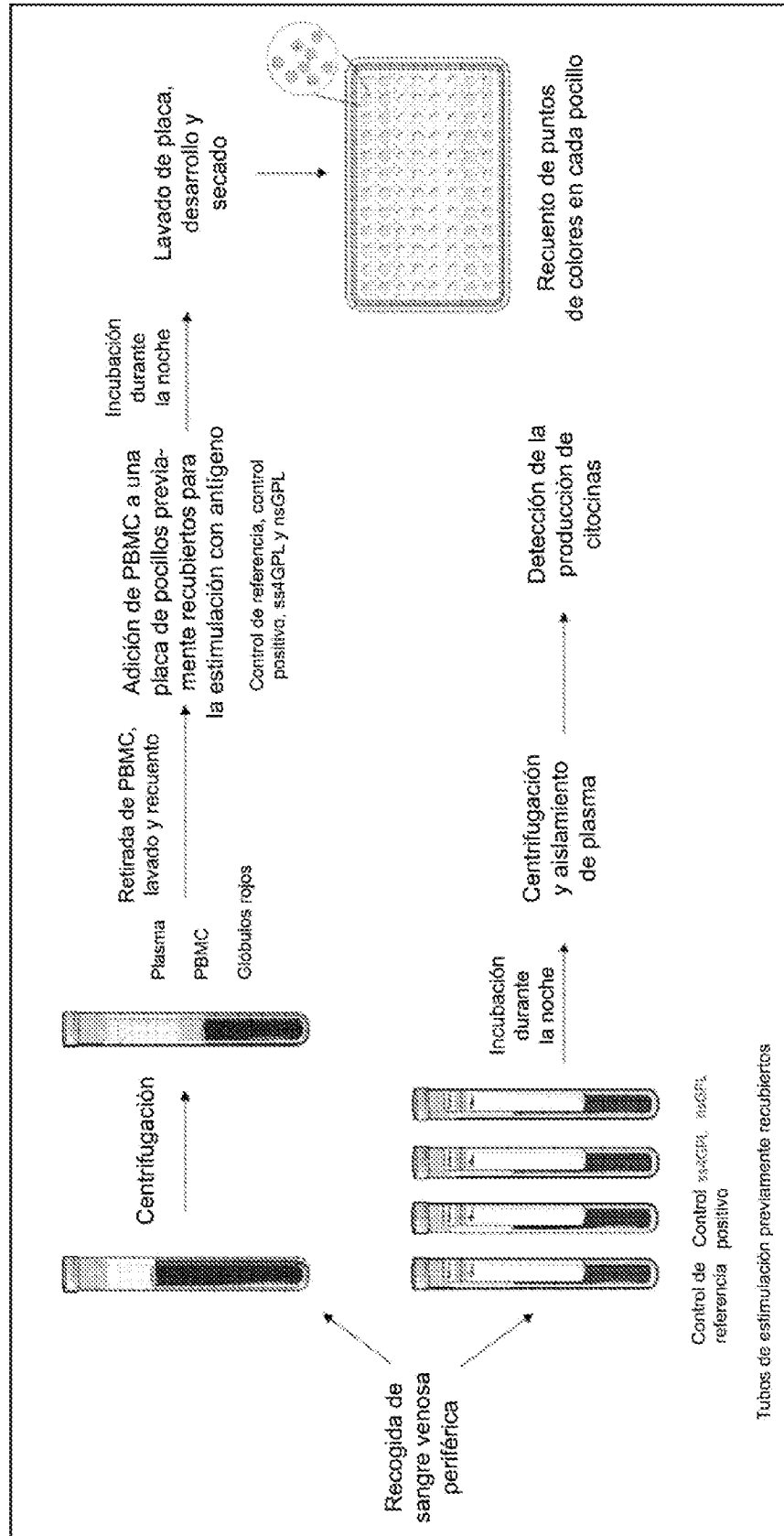


Figura 2

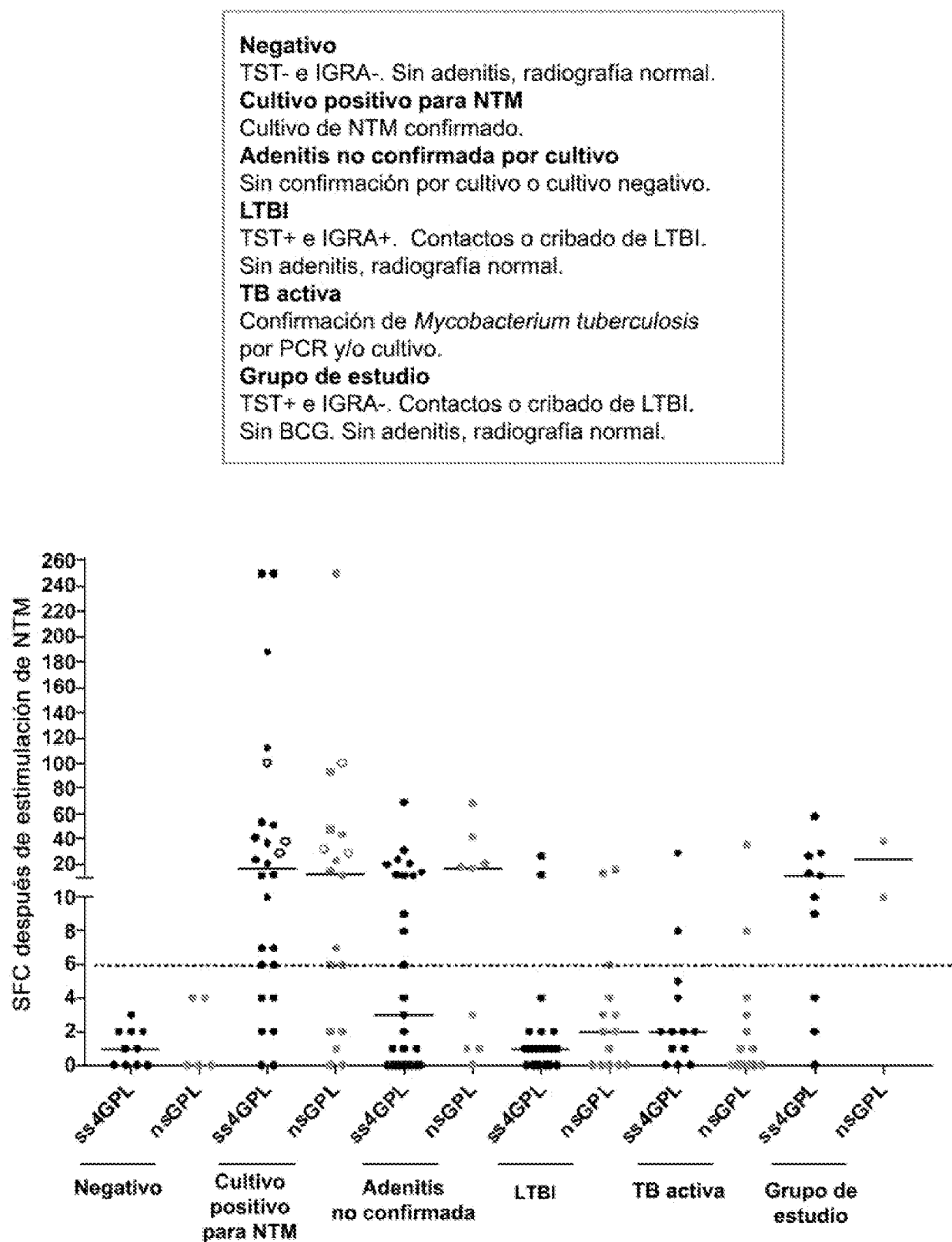


Figura 3

Negativo

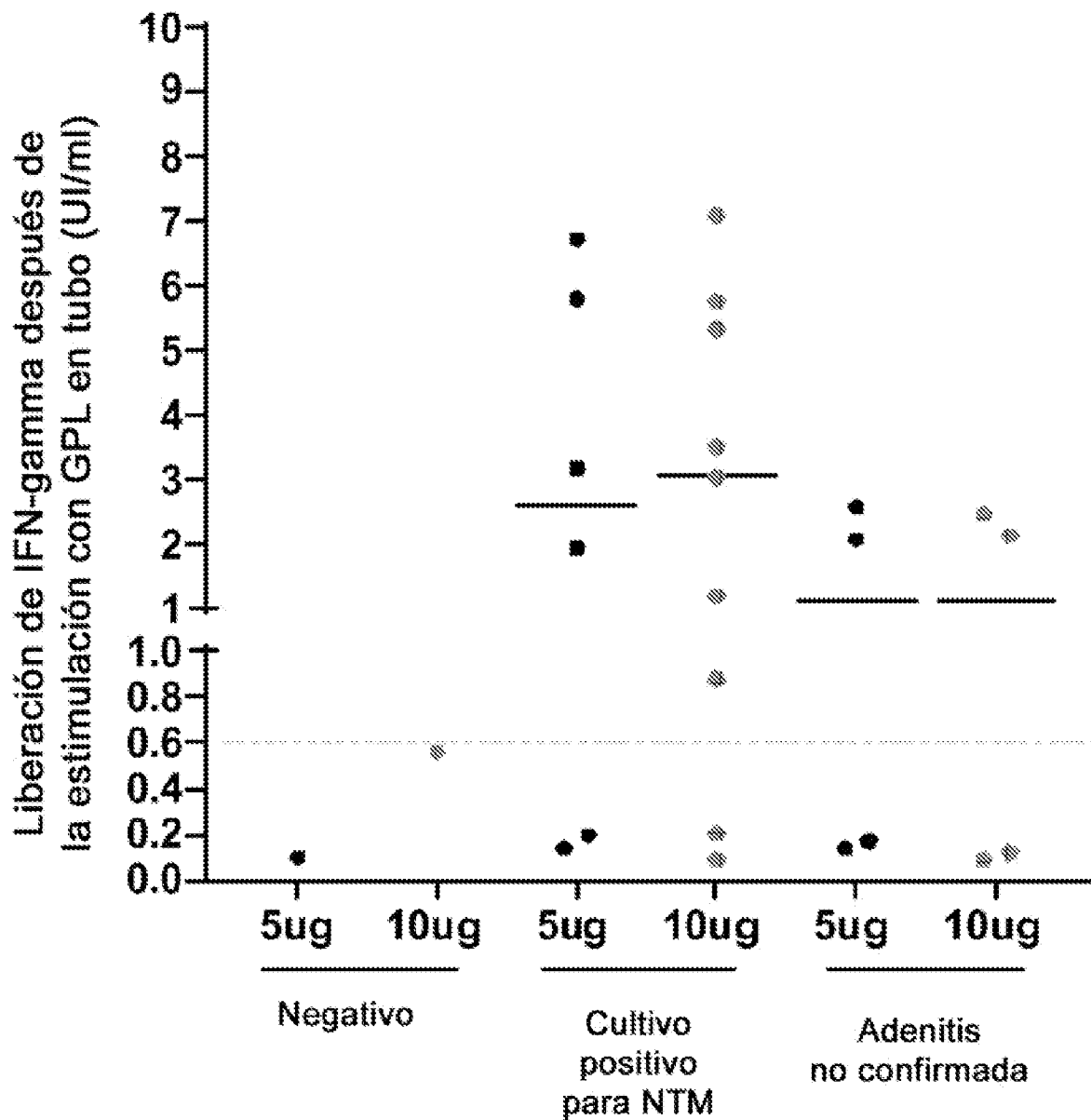
TST- e IGRA-. Sin adenitis, radiografía normal.

Cultivo positivo para NTM

Cultivo de NTM confirmado.

Adenitis no confirmada por cultivo

Sin confirmación por cultivo o cultivo negativo.



Antígenos de envoltura celular principales en MAC: los GPL

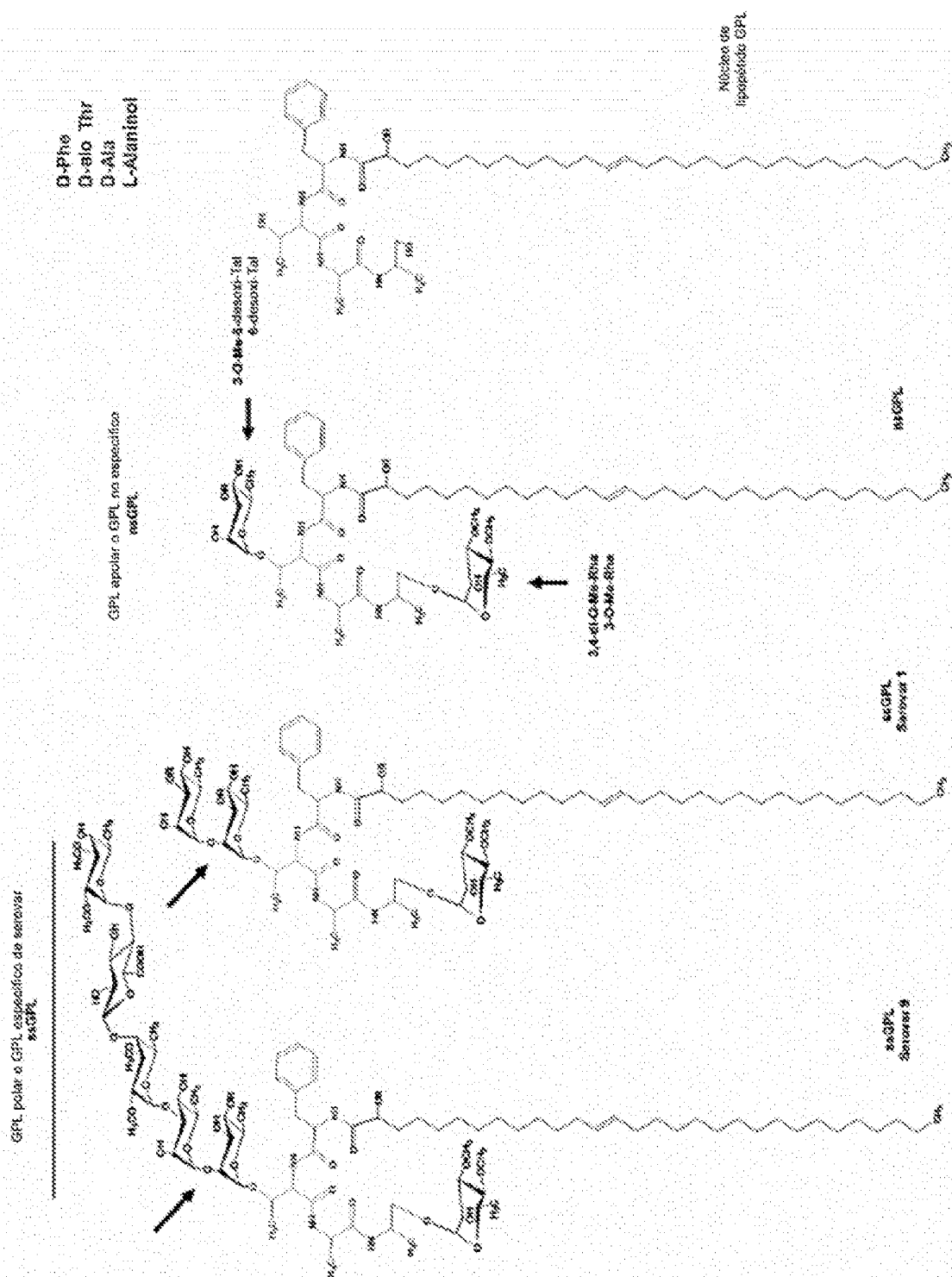
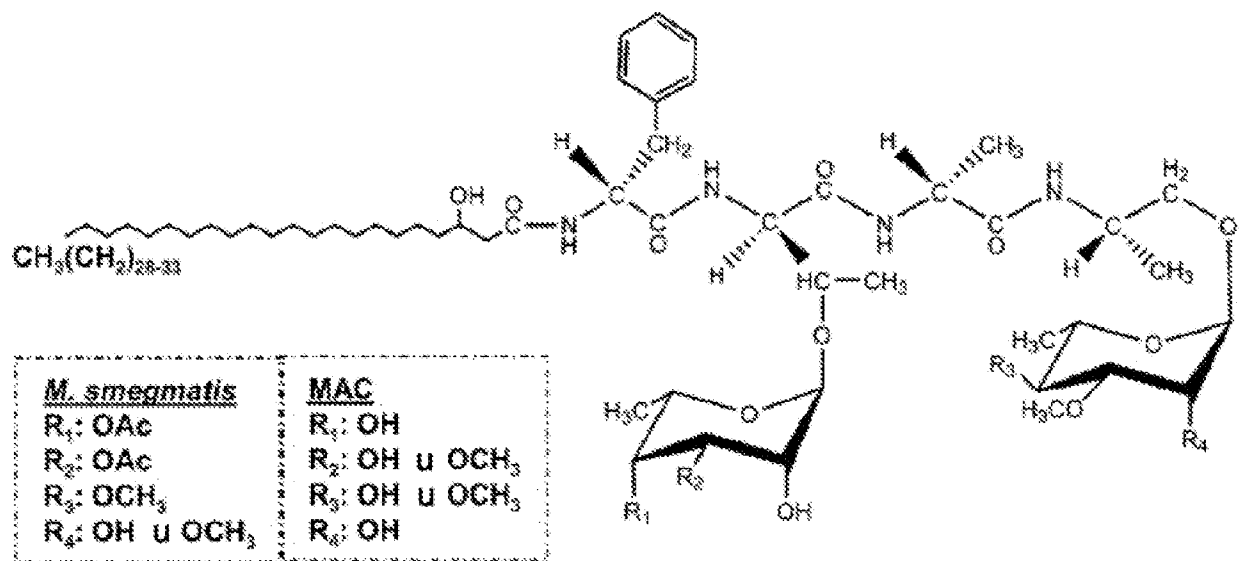


Figura 4

Figura 5



GPL no específicos (nsGPL) de MAC y *M. smegmatis*

Figura 6

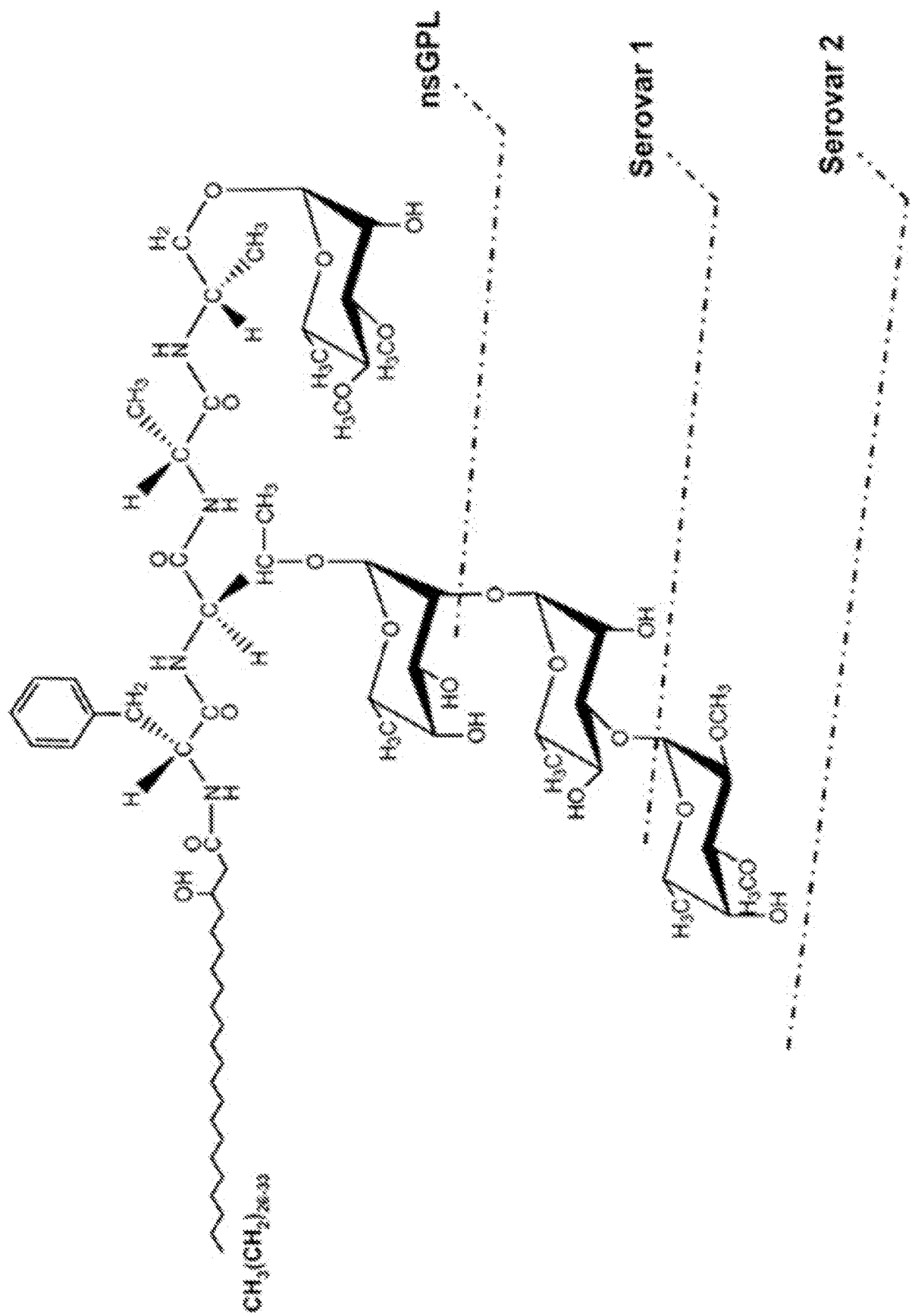


Figura 7

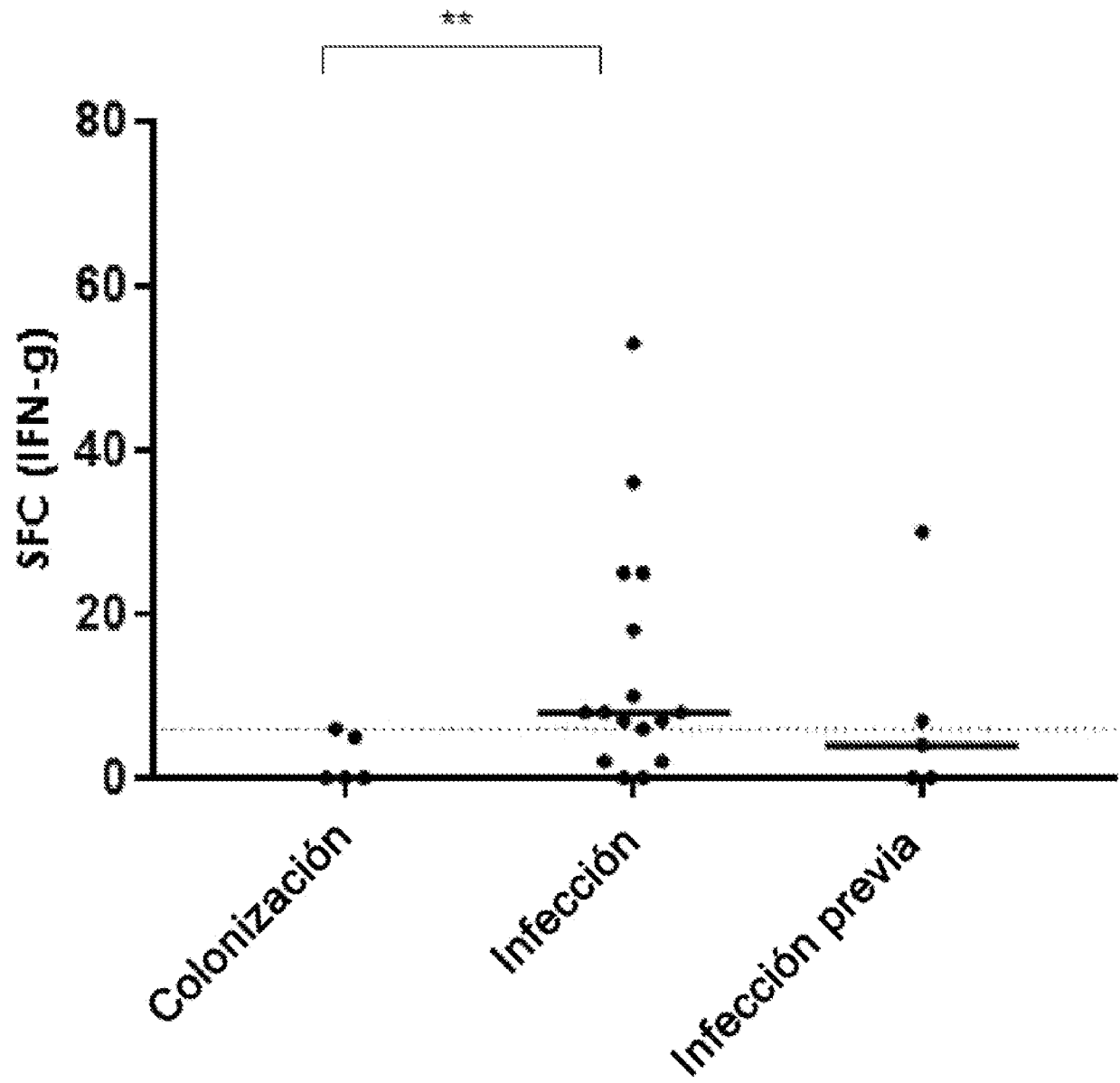


Figura 8

