



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 338**

51 Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07718589 .0**
96 Fecha de presentación : **20.03.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1996936**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2008**

54 Título: **Un método para detectar células T activadas por mitógenos o específicas de antígeno.**

30 Prioridad: **20.03.2006 AU 2006901400**

73 Titular/es: **St. Vincent's Hospital Sydney Limited
Centre for Immunology Victoria Street
Darlinghurst, NSW 2010, AU**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.12.2010

72 Inventor/es: **Kelleher, Anthony, Dominic y
Zaunders, John, James**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.12.2010

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 349 338 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).

UN MÉTODO PARA DETECTAR CÉLULAS T ACTIVADAS POR MITÓGENOS O ESPECÍFICAS DE ANTÍGENO

DESCRIPCIÓN

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con métodos para la detección de células T CD4+ o CD8+ específicas de antígeno o la medición de la inmunocompetencia general de un sujeto.

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

10 La subpoblación CD4+ de linfocitos T (células T CD4+) juega un papel principal en la defensa del cuerpo contra patógenos intracelulares tal como bacterias intracelulares patogénicas (por ejemplo Micobacterias) y hongos (por ejemplo Candida), virus y protozoarios. En particular, las células T CD4+ ayudan a regular la respuesta inmune mediada por célula a la infección mediante tales patógenos intracelulares, y de hecho se refieren frecuentemente a células T "auxiliares", al promover una variedad de respuestas inmunes de otras células (por ejemplo promoción y maduración de

15 linfocitos B y respuestas de anticuerpo, activación de macrófagos, y mejoramiento de linfocitos citolíticos naturales (NK) y actividad de célula T citotóxica CD8+ (CTL)) a través de la liberación de citoquinas en respuesta a la estimulación antigénica. Tal estimulación antigénica se logra mediante el reconocimiento por células T CD4+ "cebadas" (es decir células T CD4+ que se han expuesto previamente a un antígeno para llegar a ser "células T CD4+ específicas de antígeno") de un antígeno

20 presentado por cualquier antígeno que presenta la expresión celular de una proteína (MHC) de complejo de histocompatibilidad principal clase II apropiada. Como se mencionó anteriormente, una de las respuestas inmunes, o "funciones efectoras", provocada mediante las células T CD4+ estimuladas es la activación de macrófagos. Los macrófagos activados tienen una función vital en patógenos asesinos en los sitios de infección a través de la actividad patogénica incrementada (es decir

25 los macrófagos activados muestran una capacidad incrementada para fagocitar patógenos) y otras actividades. La interacción entre células T CD4+ específicas de antígeno y macrófagos forman la base de la denominada respuesta de hipersensibilidad del tipo tardía (DTH) que se ha explotado en varias pruebas de piel para determinar si se ha expuesto previamente un sujeto o "sensibilizado" a un antígeno particular (por ejemplo un antígeno de un patógeno o un alérgeno). Un tipo bien conocido de

30 prueba de piel DTH es la prueba Mantoux que emplea tuberculina como un antígeno en la prueba para tuberculosis latente (originada por tuberculosis Micobacterium) en un sujeto o para determinar si un sujeto se ha vacunado previamente con vacuna de tuberculosis Calmette-Guerin bacille (BCG).

La prueba Mantoux, y otras pruebas de hipersensibilidad de piel del tipo tardío similares tal como la Multiprueba BioMerieux, se han utilizado ampliamente en los laboratorios de investigación

35 diagnóstica y clínica para detectar respuestas específicas de antígeno, mediadas presuntamente por células T CD4+. Ellos, sin embargo, requieren una cantidad considerable de tiempo para desarrollar (es decir con el fin de alcanzar un resultado legible), requieren que el paciente regrese para la lectura del resultado, y existe considerable variabilidad de intraoperador en la aplicación y lectura de estas pruebas. Estos problemas combinan limitar su uso efectivo. Por ejemplo, para la prueba Mantoux, se

40 puede observar cualquier respuesta DTH algunos 2 - 3 días después de la administración del antígeno de tuberculina, que no puede ser factible o deseable para la prueba efectiva de personas vivas en ubicaciones remotas. Más aún, la evaluación de los resultados de prueba de piel es relativamente subjetiva, conduciendo a resultados cualitativos más que a resultados cuantitativos.

Aparte de las pruebas de piel DTH, se pueden detectar células T CD4+ específicas de

45 antígeno, y de hecho se miden, mediante otros métodos. Por ejemplo, utilizando células

mononucleares de sangre periférica (PBMC), las células T CD4⁺ específicas de antígeno se pueden medir por el método conocido como ensayo de linfoproliferación (LPA). Sin embargo, este método, que utiliza la capacidad de proliferación de las células T CD4⁺ in vitro e involucra detectar la incorporación de 3H-timidina en ADN nuevamente sintetizado después de 6 - 7 días en cultivo, tiene

5 varias limitaciones haciéndolo poco atractivo para laboratorios de diagnóstico, a saber: (i) el uso de altos niveles de radionucleótidos; (ii) un tiempo largo de "cambio"; (iii) el requerimiento para procesamiento largo de muestras de sangre para preparar PBMC; (iv) la dependencia de suero humano cuidadosamente seleccionado, con variabilidad de tanda a tanda; (v) la necesidad de técnicas de cultivo que requieren un alto nivel de entrenamiento; (vi) el hecho que la respuesta solo se pueda

10 atribuir a células T CD4⁺ si las células T CD4⁺ se purifican primero; y vii) la variabilidad intra e interensayo sustancial hace la estandarización entre la problemática de los laboratorios. Actualmente, los LPA se desarrollan raramente excepto en laboratorios de investigación.

Otro ejemplo es una versión de citometría de flujo del LPA, utilizando diacetato de carboxi-fluoresceína, éster succimidilo (CFSE)- marcado PBMC (1). Este ensayo es utilizado ampliamente en

15 laboratorios de investigación, y aunque este tiene distintas ventajas que no utilizan radioactividad y también permite la identificación directa para responder a células T CD4⁺, esto todavía sufre de otras desventajas de LPA. Adicionalmente, este ensayo tiene la desventaja que el análisis de citometría de flujo se pueden desarrollar muy cuidadosamente ya que el número de células relevantes puede ser muy bajo, frecuentemente en medio de teñido sustancial de fondo.

Un ejemplo adicional es el denominado ensayo de citoquina intracelular (ICC). Esto se llega a utilizar relativamente ampliamente en laboratorios de investigación, y permite la detección directa de las células T CD4⁺ específicas de antígeno en cultivos de sangre completa (2). Este ensayo tiene, sin embargo, un trabajo bastante intensivo; requiere un cultivo de 6 horas con antígenos de proteína completa (2 horas para procesamiento y presentación de antígeno, más 4 horas con brefeldian A) o

25 cultivo de 6 horas con péptidos y brefeldina A. Adicionalmente, cuando se obtienen muestras en la tarde, ellas requieren etapa de procesamiento en la noche, o de otra forma se dejan hasta el siguiente día, lo que no es óptimo. Más aún, luego se requiere después de cultivo una etapa de teñido intracelular de 2 horas, seguido por análisis citométrico de flujo. Automatización del ensayo ICC es posible (3), pero no generalmente disponible. También, es problemática la estandarización entre los

30 laboratorios.

De acuerdo con lo anterior, no hay método para detectar células T CD4⁺ específicas de antígeno entre aquellas que están actualmente disponibles que son fácilmente aplicables a los laboratorios de investigación, diagnósticos y clínicos. Adicionalmente, de aquellos que son adecuados para uso en laboratorios diagnósticos, varios problemas y dificultades con ellos los han hecho

35 impopulares. Sin embargo, los ensayos para detectar células T CD4⁺ específicas de antígeno no son solo el tipo de ensayo de respuesta inmune que ha carecido del favor de los laboratorios de diagnóstico. Es decir, la respuesta de los linfocitos del sistema inmune al mitógeno policlonal, ha utilizado ampliamente fitohemaglutinina (PHA), como una medición de inmunocompetencia de célula T general (por ejemplo para casos de inmunodeficiencia primaria sospechada (4)); sin embargo,

40 debido a que este ensayo se basa en LPA de 3H-timidina, con la excepción que las células se cosechan en el día 3, este tiene esencialmente el objeto de la misma desventaja que el LPA.

Se ha propuesto un método de sangre completa más simple en las que alícuotas pequeñas de muestras anti-coaguladas de sangre completa se incuban con un antígeno o PHA durante 4 horas (hasta 24 horas), y activación medida por la regulación por aumento del antígeno marcador de

45 activación de célula T temprana, CD69, en células T CD4⁺, mediante citometría de flujo (5). Este

ensayo de sangre completa, con un corto tiempo de cambio y lectura de superficie celular muy simple, es un método atractivo. Sin embargo, en manos del actual solicitante, se ha encontrado que aunque el ensayo es útil para medir las respuestas PHA policlonales, no es suficientemente específico para detectar células T CD4+ específicas de antígeno ya que un número mayor no viable de células T CD4+ regulan por aumento el CD69 en respuesta a antígeno indicando una carencia de especificidad con esta lectura. Adicionalmente, se encuentra que el análisis resultante se complica por la presencia de CD69 en un pequeño pero significativo subconjunto de células T CD4+ ex vivo.

Otro ejemplo de un ensayo de sangre completa para células T CD4+ específicas de antígeno que está en uso es el ensayo de estimulación de sangre completa Quantiferon® (CSL Limited, Melbourne, VIC, Australia). En este ensayo, luego de la estimulación antigénica, se recolecta plasma y se evalúa para IFN- γ mediante ELISA. Sin embargo, con el estándar LPA, no se confirma la respuesta que se debe a células T CD4+, ya que se produce mucho IFN- γ mediante células T CD8+, particularmente en respuesta a antígenos víricos, así como también con células NK presentes en los cultivos. Actualmente, este ensayo solo se licencia para la detección de respuestas a M. tuberculosis. Sin embargo, se ha observado que el ensayo da altos números de resultados indeterminados en poblaciones pediátricas jóvenes. Existe un segundo ensayo para la detección de respuestas IFN- γ estimuladas por M. tuberculosis conocido como el ensayo TB T spot aprobado para uso en Europa. Este ensayo es un método basado en ELISpot, que requiere la separación de PBMC antes de colocar en una placa ELISpot. El ensayo parece tener especificidad y sensibilidad similares, pero un menor índice de resultados indeterminados de pacientes inmunosuprimidos y pediátricos.

La US 2005/0196386 describe un método para producir "células reguladoras T supresoras CD4+CD25+ aisladas, de cultivo expandido, activadas ex vivo para la prevención o supresión de reacciones inmunes en un anfitrión". Se purifican PBMC de sangre completa, y las células CD4+CD25+ luego se aíslan de la población PBMC, y las células CD4+CD25+ aisladas in vitro se estimulan con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Se examina la expresión de CD134 en células de respuesta a CD4+CD25- de reacción de linfocito mezclado (MLR).

Una publicación por Sanchez et al. (Br. J. Haematology (2004) 126: 697-703) se dirige a medir la interacción entre células reguladoras T altas CD4+CD25 y linfocitos CD134+ no reguladores activados (es decir como dos poblaciones celulares separadas) en la sangre periférica de enfermedad de injerto versus anfitrión (GVHD) de pacientes en la ausencia de la estimulación in vitro. Una publicación por Miura et al. (Transplant Proc. (2005) 37:57-61) investiga las cinéticas de expresión de OX40 (CD134) en sangre periférica de pacientes con GVHD. Se purifican PBMC de sangre completa, y las poblaciones luego se purifican adicionalmente utilizando glóbulos MACS y/o clasificación FACS. En una serie de experimentos, se examinan niveles de mRNA OX40 sin detectar la coexpresión de CD25 y CD134.

En una publicación en 2000 (Arthritis & Rheumatism 50: 2775-2785), van Amelsfort et al. examina la presencia, fenotipo y función de células reguladoras T CD4+CD25+ en sangre periférica y fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (RA). Se purifican PBMC de sangre completa y se encuentran células CD4+CD25+OX40+ dentro de la población PBMC ex vivo de controles normales y pacientes RA (es decir en la ausencia de estimulación in vitro).

En una serie de papeles que involucran Gummert JF y Barten MJ (Transplantation (2000) 70: 1038-1049; J. Immunol. Meth. (2001) 253: 95-112; y Transplant Immunol. (2002) 10: 1-14), los niveles de expresión independientes de CD25 o CD134 (como marcadores de activación) se examinan en poblaciones de linfocitos en sangre completa luego de estimulación in vitro para examinar la

función inmune luego de tratamiento de fármaco; sin embargo, no se examina la coexpresión de CD25 y CD134.

De acuerdo con lo anterior, permanece una necesidad para el método de costo efectivo alternativo y relativamente simple para detectar, particularmente, células T CD4⁺ específicas de antígeno, pero también células T CD8⁺ específicas de antígeno.

Aunque investigar las cinéticas de la regulación por aumento del antígeno de marcador de superficie celular CD25 (una proteína de transmembrana que es la cadena α del receptor de interleukina-2 (IL-2)) y la división celular utilizando PBMC marcado CFSE, el actual solicitante encuentra que el CD25 se regula por aumento altamente en células T CD4⁺ en respuesta a antígeno o mitógeno desde 24 horas en adelante, precedido de la división celular que empieza en aproximadamente 48 horas en adelante. Al mismo tiempo, se han investigado cinéticas de expresión de ciertas proteínas de superficie celular de coestimulación tal como CD134 (OX40) y CD137 (4-1BB), y se encuentra que la regulación por aumento de estas proteínas también ocurre de 24 horas en adelante. Los estudios genéticos en modelos de ratón han mostrado que la interacción entre OX40 en células T CD4⁺ y ligando OX40 (OX40L) en células que presentan antígeno es crucial para la generación de células T CD4⁺ “memoria” (es decir células T CD4⁺ cebadas que se han desarrollado en las denominadas células de memoria capaces de conferir protección inmediata así como también la capacidad de montar una respuesta inmune efectiva y más rápida para la estimulación antigénica), y la promoción de la supervivencia de células T CD4⁺ efectoras después de cebado. Ya que este ha reportado previamente que la expresión CD134 en células T CD4⁺ picos a 24 - 48 horas después de la estimulación de célula T mediante antígeno o mitógeno, y regresa a los valores iniciales aproximadamente 120 horas después (6), el actual solicitante por lo tanto investiga si el CD25 y CD134 se coexpresan justo antes de 48 horas (es decir un punto de tiempo que corresponde con la expresión CD134 máxima, pero antes del inicio de la división celular), utilizando cultivos de sangre completa que estimulan con antígenos o mitógenos, y por lo tanto se pueden utilizar como la base de un método de costos efectivo y relativamente simple para la detección y/o medición de células T CD4⁺ específicas de antígeno. Se encuentra que estos marcadores de superficie celular para células T CD4⁺ específicas de antígeno se pueden medir fácilmente mediante citometría de flujo después de 40 - 44 horas de incubación con antígeno utilizando muestras de sangre completa anticoaguladas de heparina de sodio. Por lo tanto, el método combina la simplicidad de establecer (es decir si la necesidad de preparación de PBMC) con una lectura de citometría de flujo simple (es decir sin la necesidad de permeabilizar células y detectar citoquinas). Adicionalmente, se encuentra que el método tiene un fondo sorprendentemente bajo (<0.03% de células T CD4⁺), y al utilizar el método, hasta la fecha es posible detectar fácilmente las respuestas de células T CD4⁺ a antígenos contenidos en las preparaciones de antígenos micobacteriales, tétanos toxoides, lisato citomegalovirus (CMV), lisato vaccinia y péptidos de Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV-1). Más aún, se ha encontrado que también se puede utilizar el método en evaluar las respuestas más amplias a mitógenos tal como PHA y enteroantígeno Estafilocócico B (SEB), como una medición de inmunocompetencia general. Todavía adicionalmente, el método tiene aplicación en clasificación celular de células T CD4⁺ activadas de mitógeno o específicas de antígeno, por lo que se pueden evitar etapas de fijación y permeabilización.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para la detección cualitativa o cuantitativa de células T CD4⁺ específicas de antígeno y/o células T CD8⁺ en un sujeto, dicho método comprende detectar cualitativamente o cuantitativamente la expresión del marcador

CD25 de superficie celular y uno o más de los marcadores de superficie celular CD134 y CD137 mediante una célula T CD4+ y/o una célula T CD8+ en una muestra de sangre completa de dicho sujeto luego de la exposición in vitro de la muestra de sangre completa a un antígeno.

Preferiblemente, el método del primer aspecto comprende las siguientes etapas:

- 5 (i) cultivar la muestra de sangre completa del sujeto en la presencia del antígeno; y
- (ii) detectar cualitativamente o cuantitativamente la coexpresión de CD25 y uno o más de CD134 y CD137 mediante una célula T CD4+ y/o una célula T CD8+ en la muestra de sangre completa cultivada.

10 Preferiblemente, la etapa de detectar la expresión de CD25 y uno o más de CD134 y CD137 se desarrolla dentro de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas desde el inicio de la etapa de cultivo.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para medir la inmunocompetencia de un sujeto, dicho método comprende detectar cualitativamente o cuantitativamente la coexpresión del marcador CD25 de superficie celular y uno o más de los marcadores de superficie celular CD134 y CD137 mediante una célula T CD4+ y/o una célula T CD8+ en una muestra de sangre completa de dicho sujeto luego de la exposición in vitro de la muestra de sangre completa a un antígeno y/o mitógeno.

Preferiblemente, el método del segundo aspecto comprende las siguientes etapas:

- 20 (i) cultivar la muestra de sangre completa del sujeto en la presencia del antígeno y/o mitógeno; y
- (ii) detectar cualitativamente o cuantitativamente la coexpresión de CD25 y uno o más de CD134 y CD137 mediante una célula T CD4+ y/o una célula T CD8+ en la muestra de sangre completa cultivada.

25 Preferiblemente, la etapa de detectar la expresión de CD25 y uno o más de CD 134 y CD137 se desarrolla dentro de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas desde el inicio de la etapa de cultivo.

Preferiblemente, la etapa de cultivar consiste de cultivar la muestra de sangre completa en la presencia del antígeno.

30 En ambos aspectos de la presente invención, el antígeno se puede seleccionar del grupo que consiste de tuberculina, antígeno de núcleo del Virus de Hepatitis C (HCV), proteína 3 no estructural HCV (NS3), lisato de citomegalovirus (CMV), Fosfoproteína 65 CMV (pp65), Lisato (HSV)-1 del Virus Herpes Simplex, Lisato HSV-2, lisato vaccinia, tétano toxoide (TT), derivado de proteína purificada (PPD) de tuberculosis Micobacterium, Estreptoquinasa de antígeno estreptococcus, Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)-1 p24, y grupos de péptidos traslapantes de HIV-1 Gag, Env, Pol u otras proteínas accesorias.

En el segundo aspecto de la invención, es preferible que la etapa de cultivar consiste en cultivar la muestra de sangre completa en la presencia del mitógeno.

En ambos aspectos de la presente invención, es preferible que la etapa de detección se desarrolle dentro de aproximadamente 40 a 44 horas desde el inicio de la etapa de cultivo.

40 En ambos aspectos de la invención, es preferible que la etapa de detectar la coexpresión de CD25 y uno o más de CD 134 y CD137 mediante una célula T CD4+ y/o una célula T CD8+ consiste en detectar cualitativamente o cuantitativamente CD25 y CD 134 en células T CD4+.

45 En ambos aspectos de la invención, es preferible que la etapa de detectar la coexpresión de CD25 y uno o más de CD134 y CD137 mediante una célula T CD4+ y/o una célula T CD8+ consiste de detectar cualitativamente o cuantitativamente CD25 y CD137 en células T CD8+.

En ambos aspectos de la invención, es preferible que la etapa de detección comprenda el uso de por lo menos un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo de anticuerpos monoclonales que unen específicamente a uno de CD25, CD134 y CD137.

- En ambos aspectos de la invención, es preferible que el método comprenda adicionalmente una etapa de aislar células que coexpresan CD25 y uno o más de CD134 y CD137.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- La Figura 1 proporciona histogramas de un sujeto de control adulto saludable representativo que muestra el tñido para células T CD25+CD 134+ CD4+ en el cultivo de control (+ 0) comparado con tñido para células T CD25+CD 134+ CD4+ en respuesta a SEB, CMV, tétano toxoide (TT), y derivado de proteína purificada (PPD) de M. tuberculosis, respectivamente. El porcentaje de células T CD25+CD134+ CD4+ se muestra para cada histograma.

- La Figura 2 proporciona los resultados de tñido para células T CD25+CD134+ CD4+ en diferentes momentos de incubación de 4 a 52 horas, para dos diferentes sujetos de control adultos saludables (S001 y S002), en respuesta a TT (S001; eje izquierdo), C W (S002; eje izquierdo) y SEB (S001 y S002; eje derecho), respectivamente.

- La Figura 3 proporciona histogramas de un sujeto de control adulto saludable (C003, de la Tabla 1) que muestra el tñido para células T CD4+ CD25+CD 134+ (después de 40 hr de incubación), comparado con tñido de células T proliferantes CD4+ (definidas por tener fluorescencia CFSE reducida) en el día 7, en respuesta a 0, CMV, TT y PPD. El porcentaje de células T CD25+CD134+ CD4+ se muestra para cada histograma (izquierdo) y el porcentaje de CFSE-dim células T CD4+ también se muestra (derecho).

- La Figura 4 proporciona datos para la apariencia de células T CD25+CD134+ CD4+ en respuesta a inoculación vaccinia. (A) Histogramas representativos de tñido para células T CD4+ CD25+CD 134+ en cultivos de sangre completa en respuesta a control (izquierda) o lisato vaccinia (derecha) en diferentes días luego de inoculación, para el sujeto VS001. Se muestran los porcentajes de células T CD25+CD134+ CD4+ para cada histograma. (B) Los resultados de tñido para células T CD25+CD134+ CD4+, en respuesta a lisato vaccinia, para tres diferentes sujetos luego de inoculación. (C) Correlación de tñido para células T CD25+CD134+ CD4+, comparado con ensayo de citoquina intracelular para IFN- γ , en respuesta a lisato vaccinia, para tres diferentes sujetos luego de inoculación.

- La Figura 5 muestra la correlación de tñido para células T CD25+CD134+ CD4+, comparado con ensayo de citoquina intracelular para IFN- γ , en sangre completa de macacos que no están vacunados, vacunados utilizando una construcción que expresa la proteína de antígeno específica del grupo HIV-1 (Gag) o vacunado con una construcción que expresa el Gag HIV-1, proteína envuelta (Env), y proteínas de poliproteína de Polimerasa (Pol) y otros genes accesorios HIV-1, en respuesta al grupo de péptido de antígeno Gag HIV-1.

- La Figura 6 proporciona histogramas de un sujeto de control adulto saludable representativo (C002) y un sujeto representativo de VIH+ (S009), respectivamente, que muestra el tñido para células T CD8+ CD25+CD137+ en el cultivo de control (+ 0) comparado con tñido para Células T CD8+ CD25+CD137+ en respuesta a PHA (+ PHA); un grupo de péptidos traslapantes de antígeno Gag HIV-1 (+ HIV Gag); y un grupo de péptidos antigénicos optimizados de CMV, EBV e influenza (+ CEF), respectivamente. El porcentaje de células T CD8+ CD25+CD137+ se muestra para cada histograma.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

El actual solicitante ha encontrado que la detección de la expresión de los marcadores de superficie celular, CD25 y CD134 y/o CD137, proporciona un medio útil para detectar y/o medir células T CD4+ específicas de antígeno y/o células T CD8+ al cultivar la muestra de sangre completa, de un sujeto.

- 5 El término "específico de antígeno", utilizado en relación a células T CD4+ o células T CD8+, se entiende que significa que las células T son capaces de unir específicamente y responder al antígeno particular de interés. Adicionalmente, se entiende que las células T CD4+ o células T CD8+ que se describen como "específicas de antígeno" no son células reguladoras T (células TREG).

- 10 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para la detección cualitativa o cuantitativa de células T CD4+ y/o Células T CD8+ específicas de antígeno en un sujeto, dicho método comprende detectar cualitativamente o cuantitativamente la expresión del marcador CD25 de superficie celular y uno o más de los marcadores de superficie celular CD134 y CD137 en una muestra de sangre completa de dicho sujeto en respuesta a exposición a un antígeno.

Preferiblemente, el método del primer aspecto comprende las siguientes etapas:

- 15 (i) cultivar la muestra de sangre completa del sujeto en la presencia del antígeno; y
(ii) detectar cualitativamente o cuantitativamente la coexpresión de CD25 y uno o más de CD134 y CD137 en la muestra cultivada.

- Se puede obtener muestra de sangre completa del sujeto mediante cualquier método bien conocido por las personas expertas en la técnica (por ejemplo mediante cánula y el uso de frascos para muestra de sangre). Se puede agregar un agente anticoagulante adecuado a la muestra de sangre completa para evitar la coagulación. Un agente anticoagulante particularmente adecuado es heparina de sodio que se puede utilizar convenientemente al emplear cualesquier frasco para muestra de sangre heparinizada disponible comercialmente. Preferiblemente, los agentes anticoagulantes que quelan los iones de calcio (Ca^{2+}), tal como dextrosa de citrato ácido (ACD) o ácido etileno diaminatetracético (EDTA), se evitan ya que estos pueden interferir con la función de linfocito al evitar el influjo de calcio (9). De acuerdo con lo anterior, es preferible que las muestras de sangre completa, para uso en el método del primer aspecto, se recolecten en frascos para muestra de sangre heparinizada.

- La etapa de cultivar la muestra de sangre completa puede ser de acuerdo con cualquier método bien conocido por las personas expertas en la técnica. La muestra de sangre completa, por ejemplo, se puede mezclar con un medio de cultivo adecuado (por ejemplo medio Iscove modificado de Dulbecco) y antígeno, y se incuba a 37 °C. El antígeno se seleccionará de acuerdo con las células T CD4+ específicas de antígeno y/o células T CD8+ destinadas a ser detectadas. Así, por ejemplo, para probar la tuberculosis latente o antes de vacunación con BCG, el antígeno seleccionado puede ser antígenos tuberculina o específicos a tuberculosis tal como el objetivo antigénico secretor temprano (ESAT-6) y la proteína 10 de filtrado de cultivo (CFP-10). De forma similar, para la prueba de Hepatitis C, el antígeno seleccionado puede ser antígeno de núcleo o proteína 3 no estructural de virus de la Hepatitis C (HCV) (NS3), mientras la prueba para CMV puede utilizar fosfoproteína 65 (pp65) o un lisato CMV. Para el HIV-1, el antígeno seleccionado puede ser p24 recombinante o grupos de péptidos traslapantes de Gag, Env, Pol, u otros genes accesorios HIV-1.

- 40 Aparte de proteínas purificadas (nativa o recombinante) tal como tuberculina y HIV-1 p24, el antígeno puede ser, por ejemplo, un lisato bacterianoo vírico, virus completo muerto, fragmento de proteína antigénica (que incluye péptidos antigénicos sintéticos), un grupo de péptido traslapante (7, 8) o péptidos antigénicos optimizados, bacterias fijas o asesinas completas, preparaciones antigénicas de levadura u hongos o células líricamente infectadas o células que presentan antígeno-antígeno

pulsado. El antígeno se puede vincular a una molécula portadora adecuada o se utiliza en combinación con un adyuvante.

- Preferiblemente, la etapa de detectar la expresión de CD25 y uno o más de CD134 y CD137 se desarrolla antes que se haya dividido un número sustancial de células presentes en el cultivo. De acuerdo con lo anterior, bajo condiciones de cultivo estándar (por ejemplo 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ en aire, y utilizando un medio de cultivo estándar adecuado para el cultivo de linfocitos), la etapa de detección se desarrolla preferiblemente dentro de 60 horas y, más preferiblemente, dentro de 48 horas desde el inicio del cultivo de la muestra de sangre completa en la presencia del antígeno. Más aún, es preferible que la etapa de detección se desarrolle después de un periodo suficiente para la coexpresión de los marcadores de superficie celular (es decir CD25, CD134 y/o CD137) para ser sustancialmente regulado por aumento. De acuerdo con lo anterior, bajo condiciones de cultivo estándar, es más preferible que la etapa de detección se desarrolle dentro de aproximadamente 24 a 48 horas desde el inicio del cultivo de la muestra de sangre completa en la presencia del antígeno, y más preferiblemente, dentro de aproximadamente 40 a 44 horas desde el inicio del cultivo de la muestra de sangre completa en la presencia del antígeno.

Aunque el método puede involucrar detectar la expresión de CD25 y uno o más de CD134 y CD137, es preferible que el método consista de la detección cualitativamente o cuantitativamente CD25 y CD134 en células T CD4⁺ o detectar cualitativamente o cuantitativamente CD25 y CD137 en células T CD8⁺.

- A este respecto, se ha encontrado que pocas, si las hay, células CD4⁺ o células T CD8⁺ diferentes a células T CD4⁺ o CD8⁺ específicas de antígeno expresan estas combinaciones de los marcadores de superficie celular ex vivo, y por lo tanto esto permite la etapa de detección a ser desarrollada contra la coexpresión muy baja "fondo" de CD25 y CD134 o la coexpresión de CD25 y CD137. Como una consecuencia, se puede utilizar el método del primer aspecto de la presente invención, en particular, para detectar células T raras CD4⁺ específicas de antígeno (por ejemplo presentes en el cultivo en frecuencias de menos de 0.1% de las células T totales CD4⁺).

- La etapa de detectar los marcadores de superficie celular se puede desarrollar de acuerdo con cualquier método bien conocido por personas expertas en la técnica. Tal un método puede involucrar el uso de anticuerpos monoclonales marcados que se unen específicamente a uno de los marcadores de superficie celular, CD25, CD134 y CD137, y, preferiblemente, el uso de citometría de flujo. A este respecto, las personas expertas en la técnica entenderán que la siguiente unión con anticuerpos monoclonales marcados adecuados (por ejemplo anticuerpos anti- CD25 y anti-CD134), se pueden fijar muestras con un agente de fijado adecuado (por ejemplo paraformaldehído, que se puede utilizar en 1% en solución salina amortiguada con fosfato (PBS)) para permitir la cuantificación o determinación cualitativa posterior de los marcadores de superficie celular (por ejemplo mediante el uso de citometría de flujo) según sea conveniente (por ejemplo luego de transporte del sitio de recolección y cultivo de la muestra de sangre completa, a un laboratorio de citometría de flujo). De acuerdo con lo anterior, en el contexto de los tiempos preferidos, dados anteriormente, para desarrollar la etapa de detección, se entiende que el "teñido" (es decir con anticuerpos monoclonales adecuados marcados con tintes fluorescentes y "fijado" de las muestras cultivadas necesita solo ser desarrollado dentro del periodo preferido. Es decir, se entiende que donde se inicia el teñido y fijado 44 horas después del inicio del cultivo de la muestra de sangre completa en la presencia del antígeno, pero la cuantificación o determinación cualitativa actual de los marcadores de superficie celular no se hace hasta lo último (por ejemplo 12 a 24 horas después), que no obstante las cantidades para desarrollar la

etapa de detección dentro del periodo más preferido de aproximadamente 40 a 44 horas desde el inicio del cultivo de la muestra de sangre completa en la presencia del antígeno.

El método del primer aspecto puede comprender adicionalmente células que expresan CD25 y uno o más de CD134 y CD137. La etapa de aislamiento se puede desarrollar de acuerdo con cualquier método bien conocido por las personas expertas en la técnica, por ejemplo, al utilizar la función de clasificar la célula disponible en muchos citómetros de flujo.

El método del primer aspecto de la presente invención permite particularmente la detección cualitativa o cuantitativa de células T CD4+ específicas de antígeno (es decir el método permite monitorear las respuestas memoria de célula T CD4+). El método por lo tanto puede ser útil para la detección de células T CD4+ específicas de antígeno contra bacterias intracelulares patogénicas (por ejemplo *Micobacteria*, *Clostridium* y *Helicobacter*), hongos (por ejemplo *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus*), virus (por ejemplo Citomegalovirus (CMV), Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)-1, virus Epstein-Barr (EBV), Virus de la Influenza, Virus Measles, Virus Mumps, Virus Rubella, Virus de la Hepatitis B (HBV), virus de la Hepatitis C (HCV), virus Herpes Simplex (HSV)-1, virus HSV- 2, JC y virus Herpes de Sarcoma de Kaposi), y protozoarios (por ejemplo *Toxoplasma*, *neumocistis*, *Criptosporidio* y *Plasmodio*) bacterias extracelulares (por ejemplo *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Pseudomonas* spp.) y toxoides (tétano toxoide, Difteria toxoide). El método también puede ser útil para la detección de células T CD4+ específicas de antígeno contra autoantígenos (por ejemplo insulina, gliadina, receptor acetil colina, proteína básica mielina, ADN y cromatina,) y alérgenos (por ejemplo proteínas de ácaros del polvo doméstico o proteínas de polen de pasto). Preferiblemente, el antígeno se selecciona del grupo que consiste de tuberculina, antígeno de núcleo HCV, HCV NS3, CMV pp65, lisato CMV, lisato HSV-1, Lisato HSV-2, lisato de Virus JC, lisato vaccinia, tétano toxoide (TT), derivado de proteína purificada (PPD) de tuberculosis *Micobacterium*, Estreptoquinasa de antígeno estreptococos (SK), HIV-1 p24 y grupos de péptidos traslapantes de Gag, Env, Pol u otros genes accesorios HIV-1.

El sujeto puede ser humano u otro animal de significancia veterinaria (por ejemplo animales de granja, caballos de raza, y animales de compañía). El sujeto también puede ser un animal de laboratorio tal como un ratón o mono para uso como, por ejemplo, un modelo de enfermedad humana o en el desarrollo de vacunas, en donde es de particular interés analizar varios aspectos de la respuesta inmune.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para medir la inmunocompetencia de un sujeto, dicho método comprende detectar cualitativamente o cuantitativamente la expresión del marcador CD25 de superficie celular y uno o más de los marcadores de superficie celular CD134 y CD137 en una muestra de sangre completa de dicho sujeto en respuesta a la exposición a un antígeno y/o mitógeno.

Preferiblemente, el método del segundo aspecto comprende las siguientes etapas:

- (i) cultivar la muestra de sangre completa del sujeto en la presencia del antígeno y/o mitógeno; y
- (ii) detectar cualitativamente o cuantitativamente la coexpresión de CD25 y uno o más de CD134 y CD137 en la muestra cultivada.

Con el método del primer aspecto, la muestra de sangre completa se puede obtener del sujeto mediante cualquier método bien conocido por personas expertas en la técnica, pero se puede obtener convenientemente a través del uso de una cánula y un frasco de muestra sanguínea heparinizada. De nuevo, los agentes anticoagulantes que quelan los iones de calcio (Ca^{2+}) evitan preferiblemente que ellos interfieran con la función de linfocito.

La etapa de cultivar la muestra de sangre completa puede estar de acuerdo con cualquier método bien conocido por las personas expertas en la técnica. Así, la muestra de sangre completa se puede mezclar con un medio de cultivo adecuado y el antígeno y/o mitógeno, y se incuba a 37 °C.

Preferiblemente, en el método del segundo aspecto de la presente invención, la etapa de cultivar la muestra de sangre completa involucra cultivar en la presencia del mitógeno. El mitógeno se puede seleccionar de aquellos mitógenos bien conocidos por las personas expertas en la técnica, por ejemplo, el mitógeno se puede seleccionar del grupo que consiste de PHA, acetato de forbol miristilo (PMA), yonomicina, SEB, toxina de síndrome de choque tóxico (TEST), enterotoxina estafilococcal A (SEA), concanavalina A (Con A), mitógeno de hierba carmín, y anticuerpo monoclonal anti-CD3 opcionalmente en combinación con coestimulación CD28 y/o anticuerpo monoclonal anti-CD2.

Alternativamente, en el método del segundo aspecto de la presente invención, la etapa de cultivar la muestra de sangre completa involucra cultivar en la presencia del antígeno. Aparte de las proteínas purificadas (nativa o recombinante) tal como tuberculina, el antígeno puede ser de nuevo, por ejemplo, un lisato bacteriano o vírico, un fragmento de proteína antigénica (que incluye péptidos antigénicos sintéticos), o un grupo de péptido traslapante (7, 8). El antígeno se puede vincular a una molécula portadora adecuada o se utiliza en combinación con un adyuvante.

Preferiblemente, el antígeno se selecciona del grupo que consiste de tuberculina, antígeno de núcleo HCV, HCV NS3, CMV pp65, lisato CMV, lisato HSV-1, lisato HSV-2, lisato vaccinia, tétano toxoide (TT), derivado de proteína purificada (PPD) de tuberculosis *Micobacterium*, estreptoquinasa de antígeno estreptococcus, HIV-1 p24, y grupos de péptidos traslapantes de Gag, Pol, Env o otros genes accesorios HIV-1.

Preferiblemente, la etapa de detectar la expresión de CD25 y uno o más de CD134 y CD137 se desarrolla antes de un número sustancial de células presentes en el cultivo que se ha dividido. De acuerdo con lo anterior, la etapa de detección se desarrolla preferiblemente dentro de 60 horas y, más preferiblemente, dentro de 48 horas desde el inicio del cultivo de la muestra de sangre completa en la presencia del antígeno y/o mitógeno. Más aún, es preferible que la etapa de detección se desarrolle después de un periodo suficiente para la expresión de los marcadores de la superficie celular (es decir CD25, CD134 y/o CD137) a ser sustancialmente regulado por aumento. De acuerdo con lo anterior, es más preferible que la etapa de detección se desarrolla dentro de aproximadamente 24 a 48 horas desde el inicio del cultivo de la muestra de sangre completa en la presencia del antígeno y/o mitógeno, y más preferiblemente, dentro de aproximadamente 40 a 44 horas desde el inicio del cultivo de la muestra de sangre completa en la presencia del antígeno y/o mitógeno.

Aunque el método puede involucrar detectar la coexpresión de CD25 y uno o más de CD134 y CD137, es preferible que el método consiste en detectar cualitativamente o cuantitativamente CD25 y CD134 en células T CD4+ o detectar cualitativamente o cuantitativamente CD25 y CD137 en células T CD8+.

La etapa de detectar los marcadores de superficie celular se puede desarrollar de acuerdo con cualquier método bien conocido por las personas expertas en la técnica. Preferiblemente, la etapa de detección comprende el uso de citometría de flujo. Con el método del primer aspecto, la citometría de flujo se puede retrasar (por ejemplo durante 12 a 24 horas), si la muestra de sangre completa cultivada se fija de forma adecuada. Así, en donde la etapa de detección comprende el uso de anticuerpos monoclonales adecuados (por ejemplo anticuerpos anti-CD25 y anti-CD134) marcados con, por ejemplo, tintes fluorescentes y el uso de citometría de flujo, la muestra de sangre completa cultivada se puede teñir y se fija 44 horas después del inicio del cultivo de la muestra con el antígeno y/o mitógeno pero con la cuantificación o determinación cualitativa de los marcadores de superficie

celular (por ejemplo mediante citometría de flujo) desarrollada después. Como tal, se entenderá que la etapa de detección no obstante se ha desarrollado dentro del periodo más preferido de aproximadamente 40 a 44 horas desde el inicio del cultivo de la muestra de sangre completa en la presencia del antígeno y/o mitógeno. El método del segundo aspecto puede comprender

5 adicionalmente células aisladas que expresan CD25 y uno o más de CD134 y CD137. La etapa de aislamiento se puede desarrollar de acuerdo con cualquier método bien conocido por aquellas personas expertas en la técnica, por ejemplo, al utilizar la función de clasificación celular disponible en muchos citómetros de flujo.

De nuevo, el sujeto puede ser humano u otro animal de significancia veterinario o de

10 laboratorio. Con el fin de que la naturaleza de la presente invención se entienda más claramente, sus formas preferidas se describirán ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Ensayo de CD25/CD134 de Sangre completa humana

15 Materiales y Métodos

Sujetos

Se reclutan adultos voluntarios saludables de personal del hospital y de la universidad. Se inoculan tres sujetos con vaccinia, por razones ocupacionales, de acuerdo con directrices de seguridad y salud ocupacional locales, y proporciona muestras longitudinales, como se describen (10). También

20 se examina el VIH positivo a largo plazo no progresor, LTNP-001, quien tiene una respuesta de célula T CD4+ fácilmente detectable para HIV-1 p24 (7).

Reactivos

El mitógeno, fitohemaglutinina (PHA; Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos de América), se utiliza en cultivos de sangre completa en una concentración final de 5 µg/ml.

25 Se utiliza enterotoxina estafilococcal B (SEB; Sigma) en una concentración final de 1 µg/ml.

Se prepara el lisato CMV como se describió previamente (7) y se utiliza en una concentración final de 1/250.

El antígeno vaccinia para ensayos in vitro se prepara como se describe (10), luego de propagación de la cepa NYCBH en células HeLa. El lisato vírico completo de virus maduros

30 intracelulares se prepara mediante congelamiento y descongelamiento múltiple de células infectadas, luego de la remoción de residuos celulares mediante centrifugación a 700g durante 10min. El antígeno vírico se trata adicionalmente mediante inactivación por calor a 56°C durante 30min, que reduce el título infeccioso mediante un factor de 106 (datos no mostrados). Se utiliza lisato vaccinia en una concentración final de 1/250. Un lisato de control de células HeLa no infectadas también se prepara en

35 paralelo, y se utiliza en la misma concentración final. El antígeno micobacteriano preparado como PPD de M. tuberculosis (MTB) del Staten Serum Institute (Dinamarca). Se utiliza PPD en una concentración final de 5µg/ml.

Se obtiene tétano toxoide (TT) de Commonwealth Serum Laboratories (CSL Limited, Melbourne, VIC, Australia). Se utiliza TT de acuerdo con las direcciones del fabricante en una

40 concentración final de 2 Lf U/ml. Se utiliza HIV-1 p24 (Protein Sciences, Meriden, CT, Estados Unidos de América) en una concentración de 5µg/ml como se describió previamente (7).

Se obtienen anticuerpos monoclonales conjugados CD3-PerCP-Cy5.5, CD4-PE-Cy7, CD8-APC-Cy7, CD25-APC, CD134-PE, y CD134-FITC de Becton-Dickinson (San Jose, CA, Estados

45 Unidos de América).

Ensayos de Linfoproliferación (LPA)

Se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación de gradiente de densidad Ficoll-Hypaque como se describió previamente (7). Se incuban 1×10^5 PBMC por pozo en placas de fondo redondo de 96 pozos 6 días en RPMI 1640 (JRH, Melbourne, VIC, Australia) que contiene 10% de suero humano (Cambrex, East Rutherford, NJ, Estados Unidos de América). Se establecen cultivos de cuadruplicado que no contienen aditivo (control), o diferentes antígenos o mitógenos. Se agrega 0.5PCi de 3H-timidina (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) por pozo y se incuba durante 18 hr adicionales, seguido por cosecha celular (Canberra Packard) y se cuenta en un contador de centelleo TopCount (Packard Instrument Co. Meriden, CT, Estados Unidos de América). La media de los conteos de replicado por cada antígeno o mitógeno se divide por el medio para los cultivos de control, dando un índice de estimulación (SI). El Cpm en pozos de control está en el rango de 124-428 cpm.

El ensayo CFSE de proliferación de células T CD4+ se desarrolla como se describió previamente (7).

Ensayo de citoquina intracelular (ICC)

Se utiliza un ensayo de citoquina intracelular de sangre completa (ICC), con base en un método publicado previamente (2), utilizando citometría de flujo de 6 colores, para medir células T CD4+ específicas de vaccinia, como se describió (7, 10). En resumen, se incuba 0.5 ml de sangre completa anticoagulada Heparina de Na con anticuerpos coestimuladores CD28 y CD49d en la presencia de lisatos no aditivos (control), SEB, o vaccinia o control durante 2 hr a 37°C, seguido por 4 hr de incubación adicional con 10 µg/ml Brefeldin A (Sigma-Aldrich). Al final de esta incubación, se agrega EDTA (Sigma) a los cultivos en una concentración final de 2PM, durante 15 min a temperatura ambiente (TA). El teñido intracelular para las citoquinas se desarrolla como se describió previamente (7). En resumen, luego se incuba 100 µl de estos cultivos con 1 ml de solución FACS Lysing durante 10 min a TA, se lava una vez con 2ml de PBA. Luego se incuban glóbulos con 0.5 ml de Solución Permeabilizante FACS durante 10 min a TA, y se lava una vez con 2ml PBA. Luego se incuban células con mAb durante 30 min a TA en la oscuridad, luego se lavan una vez con 2ml de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) que contiene 0.5% de albúmina de suero bovino y 0.1% de azida de sodio (PBA), y se resuspende en 0.5% de solución amortiguada paraformaldehído/fosfato (PF/PBS).

Para análisis, se recolectan 300,000 eventos, como se describió previamente (8). Los linfocitos T se colocan primero en CD3-PerCP-Cy5.5 versus dispersión lateral, luego en células CD4-PE-Cy7-positivo/CD8-APC-Cy7-negativo, y se analizan células CD69-APC+ IFN-γ-FITC+. Este método tiene un corte validado para resultados positivos de 0.08% de células T CD4+, con base en los resultados de fondos más 3 veces la desviación estándar, de análisis de dieciséis controles negativos VIH (Munier et al, resultados no publicados)

Ensayo CD25/CD134 de sangre completa

Se mezcla 0.25 ml de sangre completa anticoagulada de Heparina Na con 0.25 ml de Medio Dulbecco Modificado Iscove (IMDM; JRH) en 5ml de jarras estériles de tapa rosca de poliestireno (Biolabs, Melbourne, VIC, Australia). Se agregan antígenos y mitógenos en las concentraciones especificadas, y se incuban cultivos, con la tapa puesta floja, a 37°C durante 40 hr en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ en aire. Los cultivos de control negativo comprendidos mezclados con sangre completa y IMDM solo, en la ausencia de cualesquier antígenos. Los cultivos de control positivos contenidos en PHA o SEB. Estos controles de cultivo positivo y negativo se incluyen en cada experimento.

Citometría de flujo

La citometría de flujo de cultivos de sangre completa se desarrolla después de fijación en un citómetro de flujo LSR II de láser dual (Becton-Dickinson) utilizando el software FACSDiva v4.1. Primero se identifican linfocitos T utilizando un CD3-PerCP-Cy5.5 vs colocación en dispersión lateral, seguido por colocación en células CD3+ CD4-PE-Cy7+ T. También, se utiliza tinte CD8-APC-Cy7 para excluir células T CD8+ del CD4+. Luego se analizan células CD3+CD4+CD8- para tinte con CD25-APC y CD134- PE. En algunos experimentos, se utilizan CD25-APC y CD134-FITC, como se indica. Todos los anticuerpos monoclonales se obtienen de Becton-Dickinson. Se analiza un mínimo de 50,000 eventos. Se revisa la compensación utilizando linfocitos teñidos con fluorocromos individuales, y luego se confirma con células teñidas simultáneamente para CD3-PerCP-Cy5.5, CD4- PE-Cy7, CD8-APC-Cy7, CD56-APC, CD19-PE, y CD14-FITC (Becton-Dickinson). Los controles adicionales incluidos en tubos individuales en los que los anticuerpos APC, PE o FITC no se incluyen (datos no mostrados).

Resultados

Controles negativos y respuestas a mitógenos y antígenos

El fondo de la coexpresión de CD25 y CD134 (OX40) en células T CD4+ en un cultivo de control (+0) se muestra en la Figura 1. De los resultados obtenidos en 31 experimentos separados, la media del fondo es 0.0062% y la desviación estándar es 0.0082%. Por lo tanto, el corte para un resultado positivo se calcula como la media + 3 x desviación estándar: $0.0062\% + 3 \times 0.0082\% = 0.03\%$.

Histogramas representativos que muestran respuestas al mitógeno SEB policlonal también se muestran en la Figura 1, demostrando las proporciones muy altas de células T CD4+ que responden a este mitógeno.

Histogramas representativos que muestran respuestas, en controles de adultos saludables, para memoria de antígenos: lisato CMV, TT, y PPD, también se muestran en la Figura 1.

Cinéticas de la coexpresión de CD25 y CD134

Las cinéticas del desarrollo de células T CD25+CD134+ CD4+ en cultivos de sangre completa se muestran para dos sujetos en la Figura 2. Los resultados muestran que las respuestas de célula T CD4+ específicas de antígeno se detectan óptimamente a 44 hr. Este punto de tiempo precede el tiempo en el que las células T CD4+ pueden empezar a proliferar in vitro, como se detecta por el CFSE LPA (datos no mostrados). Por lo tanto, las células T CD4+ medidas como CD25+CD134+ a 44 hr parece reflejar el número presente en la muestra de sangre completa original.

Las respuestas a SEB en estos experimentos de pico de resumen a 24 hr, pero se observa un segundo pico de magnitud similar por 44 hr (Figura 2). Por lo tanto, las respuestas policlonales y específicas de antígeno a los mitógenos se puede medir en el mismo punto de tiempo, 44 hr.

Comparación de los ensayos de sangre completa con ensayos de proliferación LPA y CFSE estándar

Se estudian cuatro sujetos, con diferentes respuestas de memoria a varios antígenos, incluyendo CMV, TT, PPD y HIV p24, comparando su ensayo de sangre completa con los dos diferentes ensayos de proliferación. Los histogramas de citometría de flujo representativos se muestran en la Figura 3, demostrando concordancia del ensayo de sangre completa con el ensayo CFSE de proliferación de célula T CD4+. Los resultados para tres sujetos de control adultos saludables y para un n VIH+ no progresor a largo plazo (7) se resumen en la Tabla 1. Se demuestra la especificidad del ensayo de sangre completa mediante la observación de dos de los tres sujetos de control adultos saludables son negativos para respuestas a CMV a lo largo de todos los ensayos,

aunque el tercer sujeto de control adulto saludable es positivo a lo largo de todos los tres ensayos. En general, el resultado del ensayo de sangre completa mayor, resulta en mayor proliferación, pero no parece tener variabilidad interensayo significativa, aún entre los dos ensayos de proliferación.

Evolución de una respuesta a vacuna luego de inoculación con vaccinia

- 5 Histogramas representativos muestran el desarrollo de una respuesta a vaccinia, luego de inoculación a un sujeto que nunca se le han aplicado vacunas, detectado por el ensayo de sangre completa, se muestran en la Figura 4A. El ensayo de sangre completa específica longitudinal de vaccinia resulta para 3 diferentes sujetos que nunca se le han aplicado vacunas se resumen en la Figura 4B, mostrando un patrón similar de desarrollo de la respuesta luego de inoculación de todas las
- 10 vacunas. La Figura 4C muestra la correlación de los resultados del ensayo de sangre completa específico de vaccinia versus los resultados del ensayo ICC (reportado en detalle; 10), a través de las muestras de sangre completas longitudinales. Existe una correlación fuerte entre los dos ensayos, con el intercepto de la línea de regresión muy cercana a cero. Sin embargo, el ensayo de sangre completa parece detectar células 8 veces más específicas de antígeno. Este número mayor de células T CD4+
- 15 específicas de antígeno es mucho más cercano al número de células T CD4+ específicas de antígeno presuntivas identificadas por inmunofenotipo (10). Esto consistente con observaciones previas de que los resultados ICC durante infecciones primarias HIV-1 y CMV primarias son aproximadamente 10 veces menores que las células T CD4+ específicas de antígeno presuntivas mediante inmunofenotipo (8).

- 20 Tabla 1: Concordancia de ensayo CD4+CD25+CD134+ de sangre completa, ensayo CFSE de proliferación CD4+ y ensayo de linfoproliferación (LPA)

Sujeto	Antígeno	CD25+CD134+ % de CD4	% de proliferación CFSE de CD4	Índice de estimulación LPA
C001	0	0.0	0.7	1.0
	CMV	0.0	1.0	0.9
	TT	1.4	33.4	45.4
C002	0	0.0	1.0	1.0
	CMV	0.1	30.6	10.3
	TT	3.4	13.1	25.1
C003	0	0.0	2.6	1.0
	CMV	0.0	2.9	1.0
	TT	2.7	51.5	139
	PPD	2.6	16.3	42.7
HIV+ LTNP-001	0	0.0	4.0	1.0
	HIV p24	5.9	50	75

Discusión

- 25 Los resultados demuestran que el ensayo CD25/CD134 de sangre completa de células T CD4+ específicas de antígeno tiene un fondo extremadamente bajo, logrado por la única detección simultánea de estas dos moléculas mediante anticuerpos de estos dos marcadores de superficie celular. Es bien conocido que una proporción significativa de células T CD4+ circulantes expresa un nivel comparativamente bajo de CD25, y existe frecuentemente un número pequeño de células que expresan un nivel muy bajo de CD134 (datos no mostrados). Sin embargo, virtualmente ninguna célula T CD4+

expresa los antígenos ex vivo. Así es posible, contra este muy bajo fondo, detectar células T CD4+ específicas de antígeno raras.

Los resultados muestran que las células T CD25+CD134+ CD4+ se pueden detectar fácilmente en tales cultivos a 24 a 40hr. El ensayo ejemplificado tiene un número de ventajas del ensayo CD69 de sangre completa previo, a saber: (i) adición simple de antígeno o mitógeno en una alícuota pequeña de sangre completa anticoagulada de heparina de sodio es que se requiere para establecer; (ii) las células se incuban en plasma autólogo, diferente en la situación artificial de suero humano agrupado; (iii) solo si se requiere teñido de la superficie celular, diferente de la fijación necesaria y permeabilización; (iv) tiempo de preparación de la muestra y la complejidad de los análisis citométricos de flujo son mínimos. Sin embargo, el ensayo CD25+CD134+ tiene ventajas adicionales: (v) al detectar simultáneamente CD25 y CD134 con una combinación de anticuerpos, el teñido de fondo en cultivos de control es invariablemente extremadamente bajo; y (vi) mediante conteo solo de células simultáneamente de CD25 y CD134 coexpresado en la superficie de las células, se obtiene un nivel muy alto de especificidad.

Utilizando el ensayo ejemplificado, el actual solicitante ha sido capaz de discriminar entre sujetos con respuestas a un rango diverso de antígenos que incluye antígenos víricos (es decir CMV y HIV-1), antígenos bacterianos (es decir PPD y TT) y mitógenos policlonales (es decir PHA y SEB). En todos los casos, las respuestas se correlacionan altamente con el ensayo actual "estándar dorado", el LPA, utilizando 3H-timidina o CFSE. En otra serie de experimentos, el ensayo de sangre completa CD25/CD134 también se correlaciona altamente con el ensayo ICC.

Por el contrario, el ensayo de sangre completa CD25/CD134 detecta fácilmente la respuesta policlonal muy amplia a los mitógenos PHA y SEB, lo hace adecuado para uso como un ensayo general simple de función de linfocito T.

Ejemplo 2: Ensayo de macaco CD25/CD134 de sangre completa

Materiales y Métodos

Sujetos

Se utilizan 31 macacos en este ejemplo. Se examinan tres grupos diferentes, específicamente, un grupo de control no vacunado (11 animales), un grupo vacunado con una construcción que expresa la proteína Gag HIV-1 (10 animales), y un grupo vacunado con una construcción que expresa el Gag HIV-1, Env, y proteínas Pol así como también otros genes accesorios HIV-1 (10 animales).

Construcciones

Se han descrito construcciones que expresan la proteína Gag HIV-1 y Gag HIV-1, Env, y proteínas así como también otros genes accesorios HIV-1 (12).

Reactivos

Se utiliza un grupo de péptido traslapante de 122 péptidos de Gag HIV-1 (8) en cultivos de sangre completa en una concentración final de 2µg de cada péptido/ml.

Los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón con especificidad para moléculas humanas y cuya reactividad cruzada se utiliza con moléculas de mono: anti-CD3 y anti-CD4 (PharMingen, San Diego, CA, Estados Unidos de América), anti-CD25 (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos de América), y anti-CD134 (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos de América).

Ensayo de citoquina Intracelular (ICC)

Se utiliza un ensayo ICC de sangre completa optimizado para uso en macacos, similar a aquel descrito en el Ejemplo 1 para analizar las respuestas IFN-γ en muestras de sangre periférica frescas obtenidas de los animales.

Ensayo de CD25/CD134 de sangre completa

Se desarrolla el ensayo CD25/CD134 como se describe en el Ejemplo 1 en sangre completa periférica anticoagulada de Na-Heparina fresca utilizando un grupo de péptidos traslapantes de HIV-1 Gag como el antígeno. Se evalúan muestras cultivadas para la expresión de CD3, CD4, CD25 y CD134 utilizando los anticuerpos monoclonales mencionados anteriormente.

5 Resultados y Discusión

Las respuestas a HIV-1 Gag en CD3+ células T CD4+ de monos macaco que experimentan esquemas de vacunación se miden mediante el ensayo CD25/CD134 de sangre completa y se compara con respuestas IFN- γ medidas por un ensayo ICC estándar. La comparación de los resultados, mostrada en la Figura 5, indica una correlación positiva clara, demostrando por lo tanto la
10 adecuabilidad del ensayo CD25/CD134 de sangre completa para sujetos diferentes a humanos, particularmente primates no humanos.

Ejemplo 3: Ensayo CD25/CD137 de sangre completa para detectar células T CD8+ específicas a antígeno

Materiales y Métodos

15 Sujetos

Se reclutan sujetos como se describe en el Ejemplo 1, o pueden incluir cualesquier sujetos cuyo nivel de células T CD8+ específicas de antígeno o inmunocompetencia mediada por célula T CD8+ es de interés. Por ejemplo, los sujetos que pueden ser de interés incluyen sujetos que se han vacunado contra un antígeno o se exponen a un patógeno infeccioso, así como también sujetos
20 afligidos con una enfermedad o afección, en donde se asocia la inmunidad o progresión de la enfermedad con niveles de células T CD8+ específicas de antígeno (por ejemplo enfermedades que requieren actividad de célula T citotóxica CD8+ (CTL) para aclarar células infectadas con patógeno o residuos tal como infecciones causadas por virus y otros patógenos intracelulares, que incluye HIV-1, Hepatitis B y C, Influenza A y B incluyendo Influenza Aviar, Síndrome Respiratorio Agudo Severo
25 (SARS), Virus Herpes Simplex (HSV) tipo I y II, Virus Epstein Barr (EBV), y un rango de otro virus, así como también infecciones originadas por patógenos no víricos tal como malaria; reacciones de hipersensibilidad tal como aquella inducida por el fármaco antiretrovítico abacavir, en las que las células T CD8+ parecen jugar un papel significativo en la patogenia; y respuestas a vacunas contra patógenos víricos especialmente aquellos inducidos por vacunas de ADN o vacunas con base en pox-
30 o adenovirus utilizados solos o en combinación en varios regímenes de refuerzos principales, que están destinados a inducir una respuesta de célula T CD8+).

Reactivos

Los antígenos y mitógenos que se pueden utilizar son como se describe en el Ejemplo 1; sin embargo, se puede utilizar cualquier número de antígenos o mitógenos que se conocen bien por las
35 personas expertas en la técnica. Por ejemplo, los antígenos o mitógenos pueden incluir péptidos optimizados sintetizados o conjuntos de péptido traslapante, células objetivo infectadas víricamente, tal como estirpes celulares B antólogas inmortalizadas y transformadas por EBV infectado, estirpes celulares transfectadas con moléculas MHC-1 de interés, pulsado con conjuntos de péptido o infectado con, virus tal como construcciones vaccinia que expresan los antígenos de interés. Los antígenos y
40 mitógenos utilizados en este experimento son PHA, HIV-1 Gag y un grupo de péptidos antigénicos optimizados de CMV, EBV y virus de la Influenza.

Se utilizan anticuerpos monoclonales como se describe en el Ejemplo 1 y Ejemplo 2. Sin embargo, se utiliza anti-CD137-PE (BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos de América) en lugar del anticuerpo anti-CD134.

45 Ensayo de CD25/CD137 de sangre completa

Se lleva a cabo el ensayo CD25/CD137 de sangre completa esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. Se evalúan muestras de cultivo para la expresión de CD3, CD8, CD25 y CD137 utilizando anticuerpos monoclonales y citometría de flujo.

Citometría de flujo

- 5 Se desarrolla citometría de flujo de cultivos de sangre completa en un citómetro de flujo LSR II de láser dual (Becton-Dickinson) utilizando software FACSDiva v4.1, como en el Ejemplo 1. Primero se identifican linfocitos T utilizando un CD3-PerCP-Cy5.5 vs colocación en dispersión lateral, seguido por colocación en células T CD3+ CD8-APC-Cy7+. También, el teñido con CD4-AlexaFluor700 (Becton Dickinson) se utiliza para excluir células T CD4+ de célula T CD8+. Luego se analizan células CD3+CD8+CD4- para la unión de CD25-APC y CD137-PE.

Resultados y Discusión

- Las respuestas a PHA, HIV-1 Gag y un grupo de péptidos antigénicos optimizados de CMV, EBV y virus de la Influenza virus en CD3+Células T CD8+ de controles saludables o sujetos infectados con VIH se miden por el ensayo CD25/CD137 de sangre completa. En los resultados mostrados en la Figura 6, el control adulto saludable C002 tiene una respuesta de célula T CD8+ bien definida a CMV, como se indica por el tetrámero, los análisis ICC y Elispot (desarrollados utilizando técnicas bien conocidas por las personas expertas en la técnica, datos no mostrados), y que proporciona un resultado positivo claro en el ensayo CD25/CD137 de sangre completa. Por el contrario, un sujeto infectado con VIH, S009, no exhibe una respuesta CMV (consistente con su carencia de respuesta de célula T CD4+ a CMV; datos no mostrados), pero tiene una respuesta positiva clara a péptidos Gag VIH, demostrando por lo tanto la adecuabilidad del ensayo CD25/CD137 de sangre completa para estudio y detección de células T CD8+ específicas de antígeno. Estos resultados son consistentes con el involucramiento reportado CD137 en memoria de la generación de célula T CD8+ y la supervivencia de estudios genéticos en ratones (11).

- 25 El método de la invención se puede utilizar por lo tanto para detectar células T CD8+ específicas de antígeno mediante medición cuantitativamente o cualitativamente de la expresión de CD25 y CD137 en la muestra de sangre completa en respuesta a exposición a un antígeno. De acuerdo con lo anterior, el método es útil para detectar respuestas de célula T CD8+ específicas a antígenos de interés, tal como aquellos contenidos en conjuntos de péptido traslapantes o péptidos optimizados derivados de antígenos víricos tal como CMV, EBV, otros virus del herpes, VIH y otros retrovirus (Virus Linfotrópicos T Humanos (HTLV)-1 y -2, Virus de inmunodeficiencia de Simio (SIV), virus recombinante HIV-SIV (SHIV)), virus vaccinia de vaccinia nativo o recombinante o vectores vaccinia modificados que expresan los antígenos de interés y otros pox virus recombinantes (por ejemplo virus de la viruela de zorro y virus de la viruela aviar), influenza, Virus de la Hepatitis particularmente B y C, parvovirus, Virus JC, y un rango de virus de murino.

Más aún, el método también se puede utilizar en la evaluación de las respuestas más amplias a mitógenos tal como PHA (como se muestra en la Figura 6), SEB, y anti-CD3 y anti CD28, como una medida de inmunocompetencia general.

Ejemplo 4: Ensayo de célula de bazo de ratón CD25/CD134

- 40 Materiales y Métodos

Inmunización de ratones

- Se inoculan cuatro ratones C57BL/6 subcutáneamente con 0.4 mg de metil-Albúmina de Suero Bovino (mBSA; Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos de América) emulsificado en Adyuvante de Freund Completo (Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos de América). Después de 7 días, se inyectan ratones en la almohadilla de la pata derecha con 200 µg de mBSA, y como control,

con PBS en la almohadilla de la pata izquierda. Después de 24-48 hr, las almohadillas de las patas se examinan y se mide la máxima inflamación. No se inoculan ratones de control con mBSA. Los ratones se sacrifican en el día 8.

Cultivo celular

- 5 Los bazo de estos ratones se muelen y pasan a través de una malla estéril de 70 μm y suspensiones celulares únicas ($1-2 \times 10^6$ células/ml) cultivadas en RPMI 1640 que contiene 10% de suero de becerro fetal durante 44 horas en la presencia o ausencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ de metil-BSA. El mitógeno, fitohemaglutinina (PHA; Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos de América), se utiliza en cultivos adicionales en una concentración final de 5 $\mu\text{g/ml}$, como un control positivo.

- 10 Anticuerpos monoclonales y citometría de flujo

Los siguientes anticuerpos monoclonales con especificidad para antígenos de superficie celular de ratón se utilizan: anti-CD3- Pacific Blue, anti-CD4 Alexa Fluor 700, anti-CD25-APC y anti-CD134-PE (PharMingen, San Diego, CA, Estados Unidos de América).

- 15 Se tiñen células y se analizan en un citómetro de flujo LSR II como se describió en el Ejemplo 1.

Resultados y Discusión

- 20 En ratones inmunizados, inflamación de la almohadilla de las patas 24-48 hr después de exposición intradérmica con metil-BSA confirma que el ratón ha reaccionado con metil-BSA in vivo (Jiang et al, no publicado; datos no mostrados). Un día después, se sacrifican estos ratones y se remueven los bazo.

- 25 Después de 44 hr del cultivo de célula de bazo in vitro con PHA, el porcentaje medio de células T CD4+ que son CD25+ CD134+ es 66% para todos los ratones. Para células de bazo de ratones inmunizados que se cultivan con metil-BSA, el porcentaje medio de células T CD4+ que son CD25+ CD134+ es 1.81%. Para células de bazo de ratones inmunizados de control, el porcentaje medio de células T CD4+ que son CD25+CD134+ es 0.04%.

Estos resultados demuestran que el ensayo CD25/CD134 también se puede utilizar para detectar células T CD4+ específicas de antígeno en los ratones.

- 30 En resumen, los ensayos CD25/CD134 y CD25/CD137 de sangre completa de ejemplo tienen varias ventajas sobre los métodos actuales, incluyendo el caso de establecimiento de cultivo (es decir no necesita preparar PBMC), simplicidad de la preparación para análisis (solo antígenos de superficie celular), simplicidad de análisis de citometría de flujo (análisis de cuatro colores, que puede correr en la amplia mayoría de citómetros de flujo actualmente en uso en laboratorios clínicos), cubrimiento de un muy amplio rango de respuestas (de células específicas de antígeno raras a respuestas policlonales a mitógenos) y puede hacer uso de volúmenes de sangre pequeños que es una ventaja especialmente en poblaciones pediátricas. Adicionalmente, los ensayos pueden permitir el transporte de las muestras postfijación de tal manera que los ensayos se pueden establecer en el sitio, pero con detección de citometría de flujo conducida en un centro especialista.

- 35 Los ensayos de CD25/CD134 y CD25/CD137 son adecuados para una variedad de aplicaciones incluyendo:

- 40 1. Determinación de inmunodeficiencia general mediante la medición de la respuesta a un mitógeno (por ejemplo PHA);
2. Monitorear respuestas a patógenos (por ejemplo agentes microbianos comunes y otros microbios ambientales), para el que están disponibles preparaciones de antígeno apropiadas, tal como: bacterias, hongos, virus y protozoarios;

3. Monitorear la pérdida de respuestas a infecciones mediante tales patógenos (por ejemplo CMV) en sujetos con inmunodeficiencia avanzada debido a infección por HIV-1;

4. Monitorear las respuestas de vacuna (por ejemplo a Vaccinia, TT, BCG (MTB), HIV-1 y sarampión, paperas y rubéola (MMR));

5. Identificación de células T CD4+ específicas de antígeno para fenotipo detallado (por ejemplo marcadores de diferenciación tal como Th1 vs Th2; marcadores de tráfico tal como ganglios linfáticos humanos versus intestino- o piel humana; receptores de citoquina; y receptores de quimioquina);

6. Clasificación celular de células T CD4+ específicas de antígeno no fijas o células T CD8+ después de cultivo de 44 hr (por ejemplo permitir cultivos celulares cuantitativos, ensayos funcionales en poblaciones purificadas de células específicas de antígeno, evaluación de los requerimientos de activación y efectos diferenciales de varias poblaciones de células que presentan antígeno en activación/ proliferación celular, para realizar el perfil del gen, y análisis receptor de célula T). Actualmente, la identificación citométrica de flujo de células T CD4+ específicas de antígeno para clasificación celular involucra usualmente el ensayo ICC, en el que las células se fijan y se permeabilizan precluyendo el crecimiento adicional in vitro. En contraste, las células clasificadas de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para trabajo in vitro o, quizás, aún trabajo in vivo tal como experimentos de reinfusión en ratones, macacos y, potencialmente en humanos. Las células también se pueden utilizar para el aislamiento de especies de ARN para realizar el perfil del gen.

7. Detección simple para antígenos potenciales de mezclas crudas;

8. Monitoreo de respuestas a autoantígenos bien caracterizados, tal como antígenos nucleares o alérgenos (por ejemplo proteínas de ácaro de polvo doméstico o proteínas de polen de pasto);

9. Son limitantes los pediátricos y otras situaciones donde volúmenes de sangre; y

10. Detectar células T CD4+ activadas de mitógeno o específicas de antígeno o células T CD8+ en un animal de significancia veterinaria (por ejemplo animales de granja, caballos de raza, y animales de compañía) o en un animal de laboratorio (por ejemplo un ratón o mono para uso como, por ejemplo, un modelo de enfermedad humana o en el desarrollo de vacunas, u otras formas de inmunoterapia, estimuladora o supresora, en donde es de interés particular analizar varios aspectos de la respuesta inmune).

A través de esta especificación la palabra "comprende", o variaciones tal como "que comprende" o "que comprenden", se entenderá que implica la inclusión de un elemento mencionado, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas.

REFERENCIAS

1. Lyons, AB, and CR Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 171:131.
2. Nomura, LE, JM Walker, and HT Maecker. 2000. Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4(+) T cells. *Cytometry* 40:60.
3. Suni, MA, HS Dunn, PL Orr, R de Laat, E Sinclair, SA Ghanekar, BM Bredt, JF Dunne, VC Maino, and HT Maecker. 2003. Performance of plate-based cytokine flow cytometry with automated data analysis. *BMC Immunol* 4:9.
4. Buckley, RH 2004. Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. *Annu Rev Immunol* 22:625.

5. Perfetto, SP, TE Hickey, PJ Blair, VC Maino, KF Wagner, S Zhou, DL Mayers, D St Louis, CH June, and JN Siegel. 1997. Measurement of CD69 induction in the assessment of immune function in asymptomatic HIV-infected individuals. *Cytometry* 30:1.
6. Croft, M 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 3:609.
7. Zaunders, JJ, WB Dyer, B Wang, ML Munier, M Miranda-Saksena, R Newton, J Moore, CR Mackay, DA Cooper, NK Saksena, and AD Kelleher. 2004. Identification of circulating antigen-specific CD4⁺ T lymphocytes with a CCR5⁺, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. *Blood* 103:2238.
8. Zaunders, JJ, ML Munier, DE Kaufmann, S Ip, P Grey, D Smith, T Ramacciotti, D Quan, R Finlayson, J Kaldor, ES Rosenberg, BD Walker, DA Cooper, and AD Kelleher. 2005. Early proliferation of CCR5⁺ CD38⁺⁺⁺ antigenspecific CD4⁺ Th1 effector cells during primary HIV-1 infection. *Blood* 106:1660.
9. Lewis, RS. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 19:497-521.
10. Zaunders JJ, Dyer WB, Munier ML, Ip S, Liu J, Amyes E, Rawlinson W, De Rose R, Kent SJ, Sullivan JS, Cooper DA, Kelleher AD. 2006. CD127⁺CCR5⁺CD38⁺⁺⁺ CD4⁺ Th1 effector cells are an early component of the primary immune response to vaccinia virus and precede development of interleukin-2⁺ memory CD4⁺ T cells. *J Virol.* 80 (20):10151-61.
11. Whitmire, JK and Ahmed, R. 2000. Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Current Opinion in Immunology* 12(4): 448-55.
12. De Rose R, Batten CJ, Smith MZ, Fernandez CS, Peut V, Thomson S, Ramshaw IA, Coupar BE, Boyle DB, Venturi V, Davenport MP, Kent SJ. 2007. Comparative efficacy of subtype AE simian-human immunodeficiency virus priming and boosting vaccines in pigtail macaques. *J Virol.* 81:292-300.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección cualitativa o cuantitativa de células T CD4+ específicas de antígeno y/o Células T CD8+ en un sujeto, dicho método comprende detectar cualitativamente o cuantitativamente la coexpresión del marcador CD25 de superficie celular y uno o más de los marcadores de superficie celular CD134 y CD137 mediante una célula T CD4+ y/o una célula T CD8+ en una muestra de sangre completa de dicho sujeto luego de la exposición in vitro de la muestra de sangre completa a un antígeno.
2. El método de la reivindicación 1 que comprende las siguientes etapas:
 - (i) cultivar la muestra de sangre completa del sujeto en la presencia del antígeno; y
 - (ii) detectar cualitativamente o cuantitativamente la coexpresión de CD25 y uno o más de CD134 y CD137 mediante una célula T CD4+ y/o una célula T CD8+ en la muestra de sangre completa cultivada.
3. Un método para medir la inmunocompetencia de un sujeto, dicho método comprende detectar cualitativamente o cuantitativamente la coexpresión del marcador CD25 de superficie celular y uno o más de los marcadores de superficie celular CD134 y CD137 mediante una célula T CD4+ y/o una célula T CD8+ en una muestra de sangre completa de dicho sujeto luego de la exposición in vitro de la muestra de sangre completa a un antígeno y/o mitógeno.
4. El método de la reivindicación 3 que comprende las siguientes etapas:
 - (i) cultivar la muestra de sangre completa del sujeto en la presencia del antígeno y/o mitógeno; y
 - (ii) detectar cualitativamente o cuantitativamente la coexpresión de CD25 y uno o más de CD134 y CD137 mediante una célula T CD4+ y/o una célula T CD8+ en la muestra de sangre completa cultivada.
5. El método de la reivindicación 4 en donde dicha etapa de cultivo consiste de cultivar la muestra de sangre completa en la presencia del antígeno.
6. El método de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el antígeno se selecciona del grupo que consiste de tuberculina, antígeno de núcleo del Virus de Hepatitis C (HCV), proteína 3 no estructural HCV (NS3), lisato de citomegalovirus (CMV), Fosfoproteína 65 CMV (pp65), Lisato (HSV)-1 del Virus Herpes Simplex, lisato HSV-2, lisato vaccinia, derivado de tétano toxoide (proteína purificada, TT) (PPD) de tuberculosis Micobacterium, Estreptoquinasa de antígeno estreptococcus, Virs de Inmunodeficiencia Humana (VIH)-1 p24, y grupos de péptidos traslapantes de HN-1 Gag, Env, Pol u otras proteínas accesorias.
7. El método de la reivindicación 4 en donde dicha etapa de cultivar consiste de cultivar la muestra de sangre completa en la presencia del mitógeno.
8. El método de la reivindicación 2 o 4 en donde la etapa de detección se desarrolla dentro de aproximadamente 24 a 48 horas desde el inicio de la etapa de cultivo.
9. El método de la reivindicación 8 en donde la etapa de detección se desarrolla dentro de aproximadamente 40 a 44 horas desde el inicio de la etapa de cultivo.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde la etapa de detectar la coexpresión de CD25 y uno o más de CD134 y CD137 mediante una célula T CD4+ y/o una célula T CD8+ consiste en detectar cualitativamente o cuantitativamente CD25 y CD134 en células T CD4+.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde la etapa de detectar la coexpresión de CD25 y uno o más de CD134 y CD137 mediante una célula T CD4+ y/o una célula T CD8+ consiste de detectar cualitativamente o cuantitativamente CD25 y CD137 en células T CD8+.
- 5 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde la etapa de detección comprende el uso de por lo menos un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo de anticuerpos monoclonales que unen específicamente a uno de CD25, CD134 y CD137.
- 10 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en donde el método comprende adicionalmente una etapa de aislar células que coexpresan CD25 y uno o más de CD134 y CD137.
14. El método de la reivindicación 13 en donde la etapa de aislamiento comprende el uso de por lo menos un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo de anticuerpos monoclonales que unen específicamente a uno de CD25, CD134 y CD137.
- 15 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en donde el sujeto es humano.

FIGURA 1

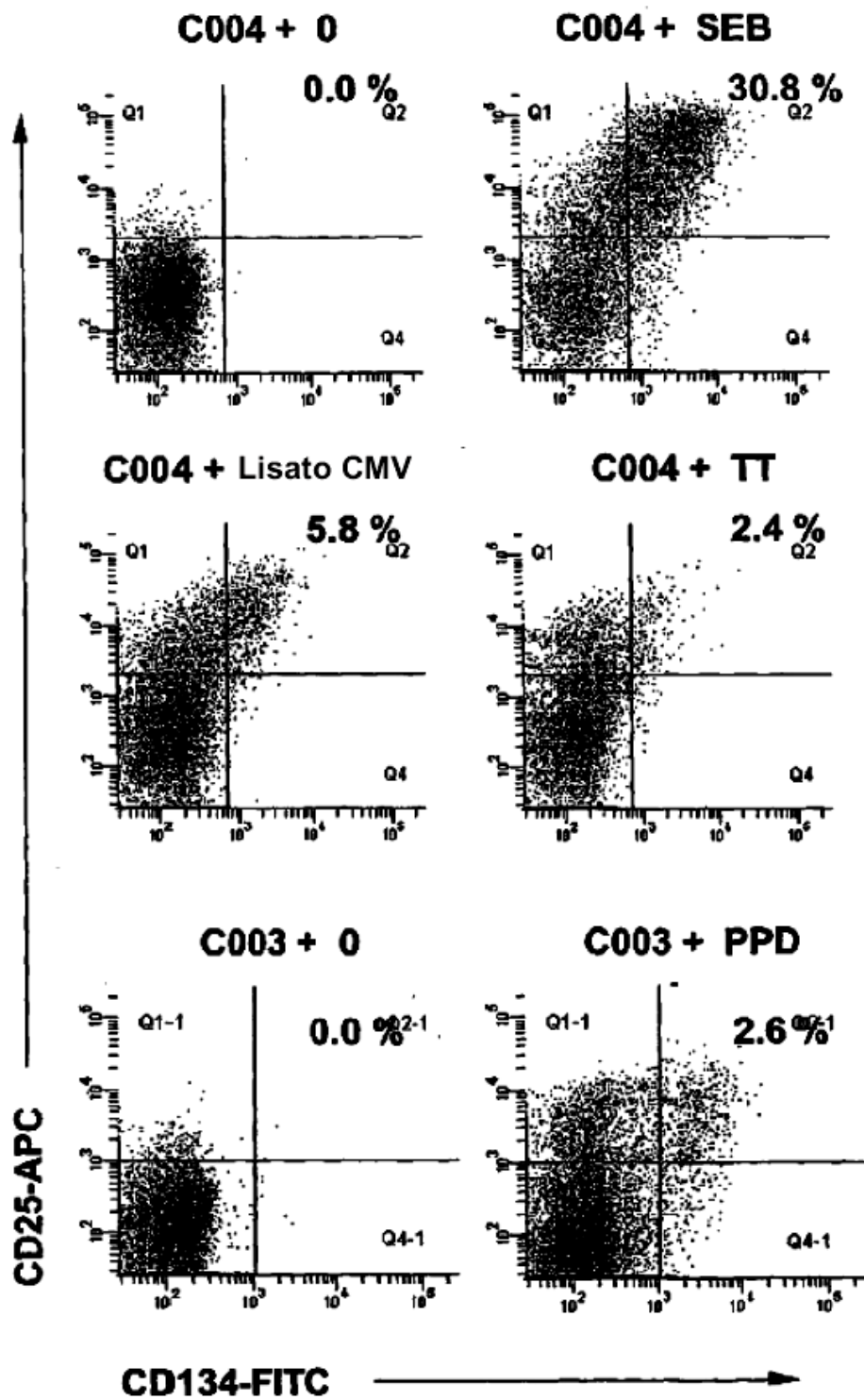


FIGURA 2

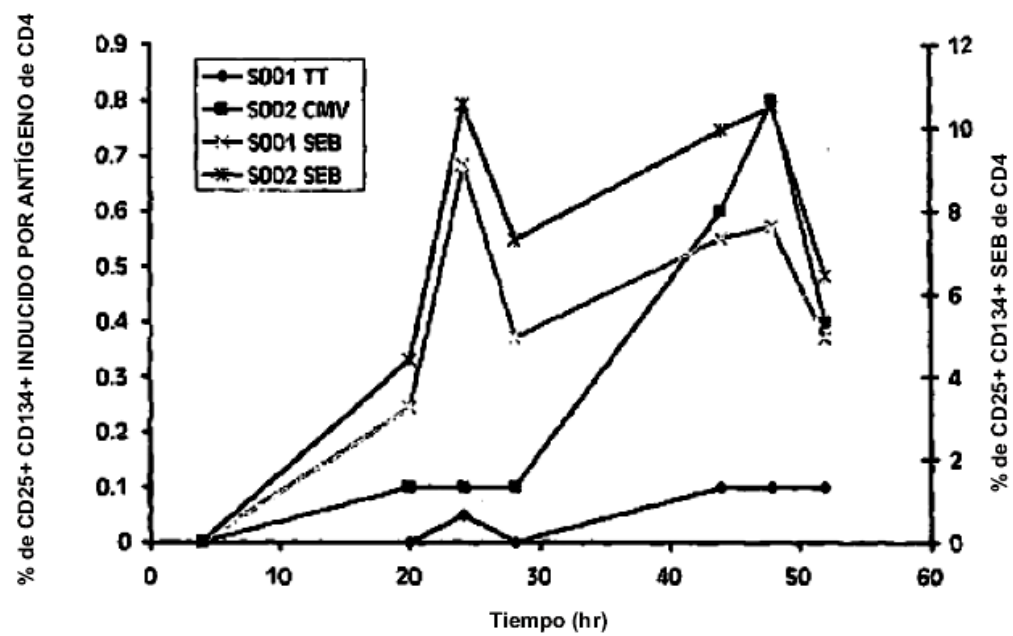


FIGURA 3

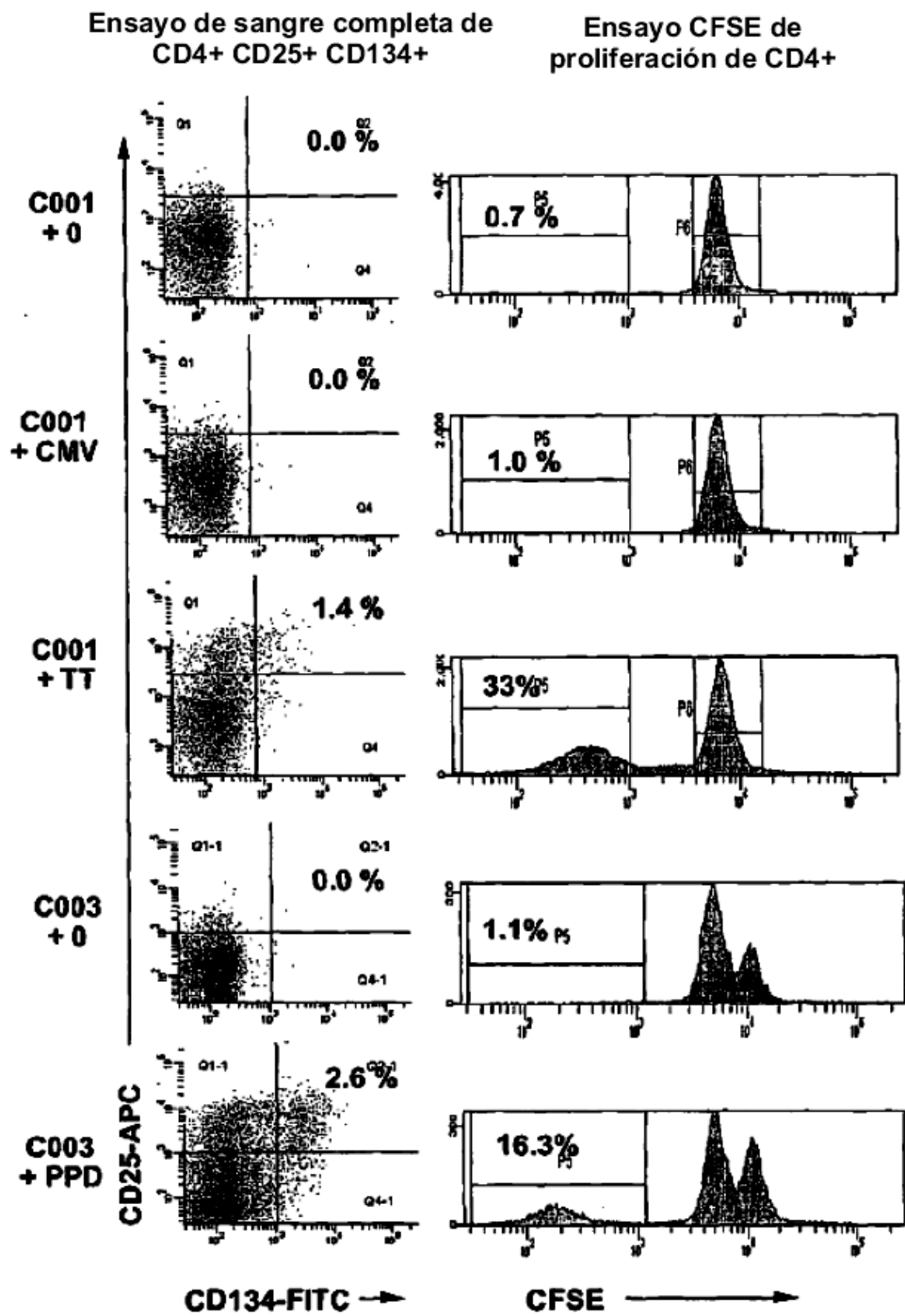


FIGURA 4(A)

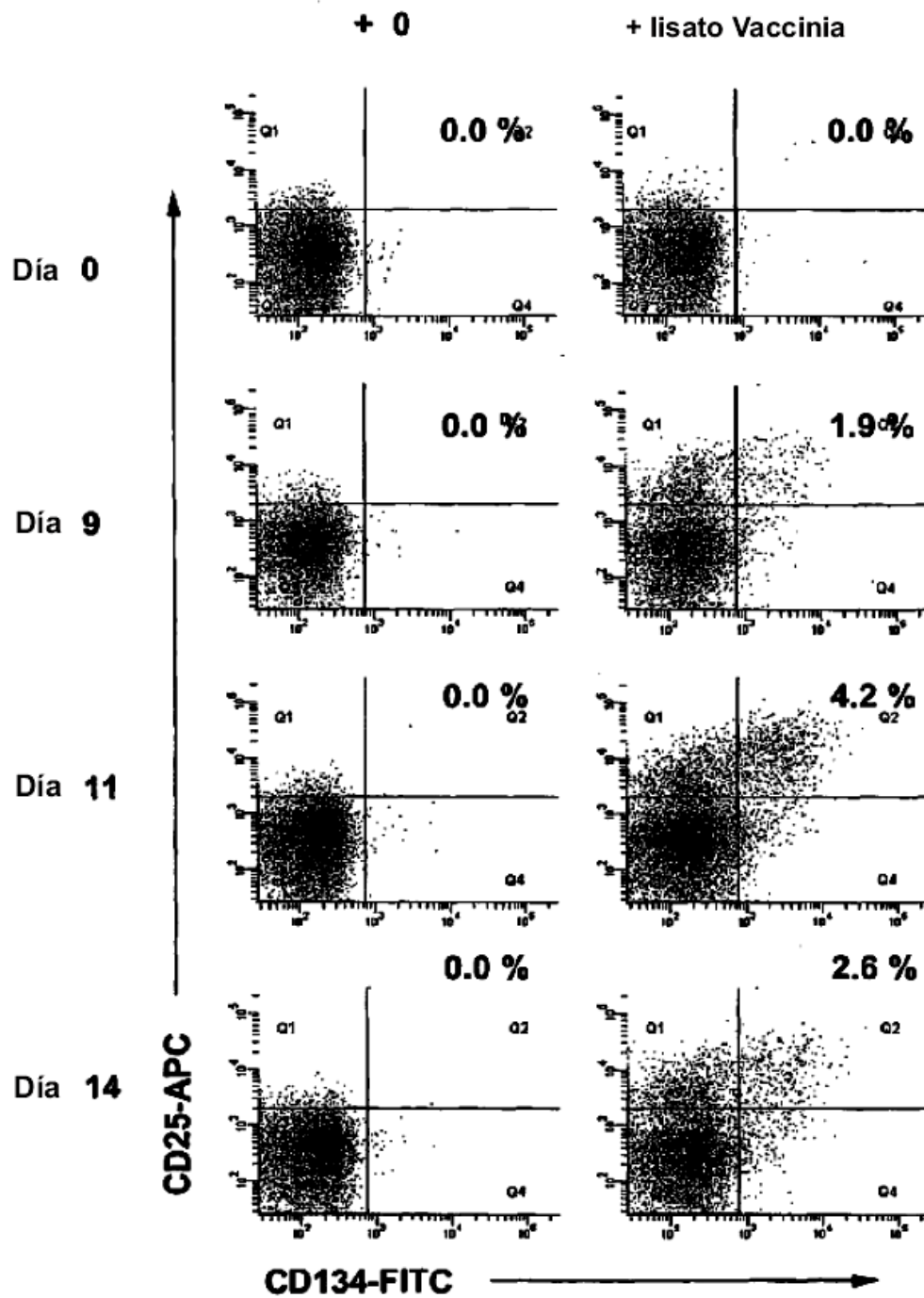


FIGURA 4(B)

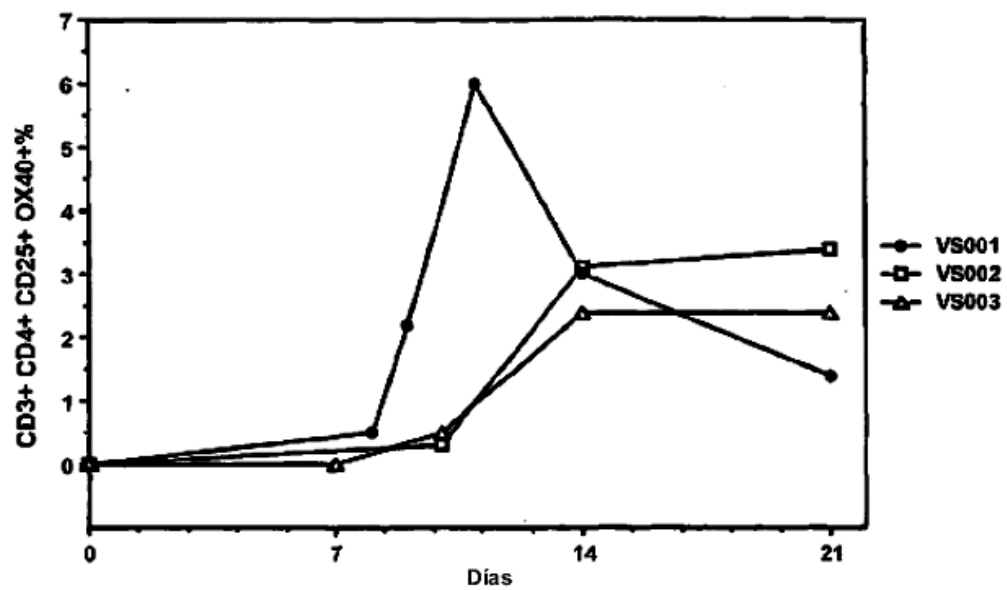


FIGURA 4 (C)

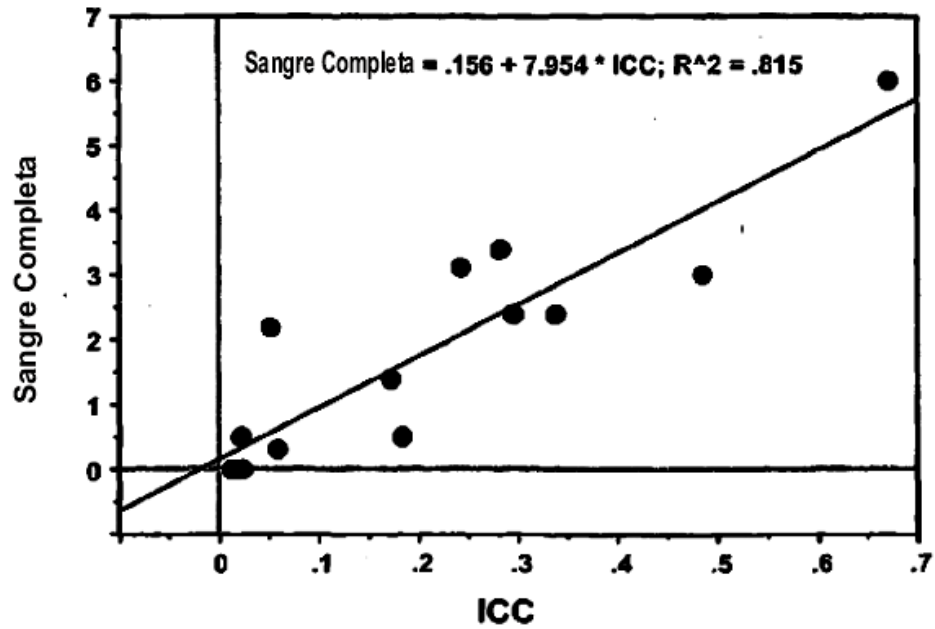


FIGURA 5

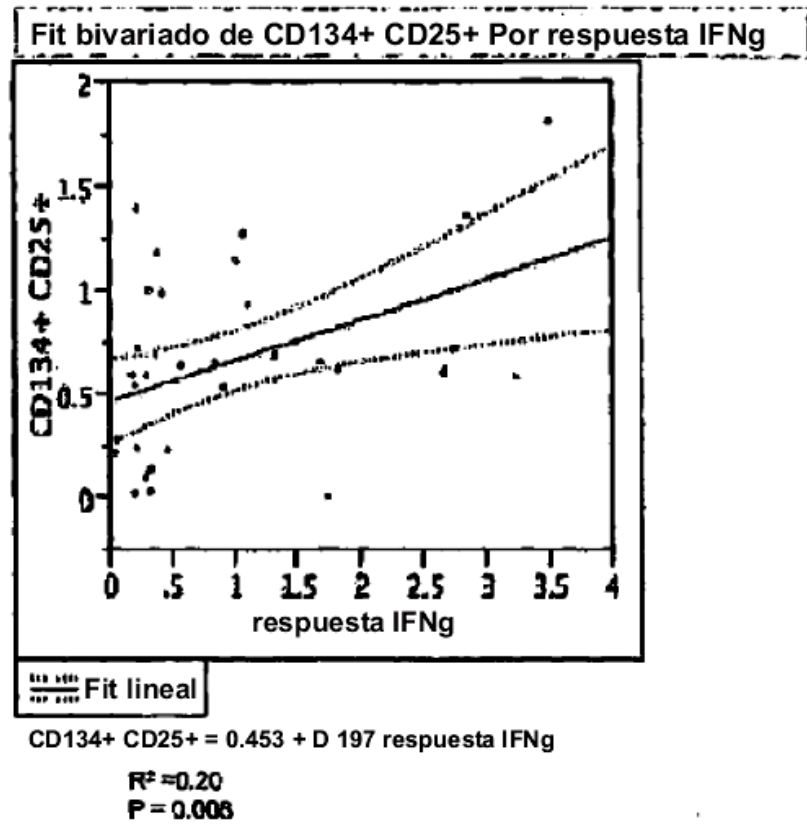


FIGURA 6

