



No. 12-162307- -00000-0000

Fecha: 2012-09-19 16:38:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



# Industria y Comercio

## SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL  
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE  
INVENCION

TITULO: PROCESO IN VITRO PARA LA DETERMINACIÓN RÁPIDA EN UN  
PACIENTE DEL ESTADO DE INFECCIÓN CON MYCOBACTERIUM  
TUBERCULOSIS.

SOLICITANTE: RED FLAG DIAGNOSTICS GMBH

DIRECCIÓN: Starterzentrum der Uniklinik, Gebäude 7, 66424 Homburg,  
Alemania.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 19 de Septiembre 2012

P2012/000115



No. 12-162307- -00000-0000

Fecha: 2012-09-19 16:38:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

## PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

## PATENTE PCT

## ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2012/000115

## SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE  
(71)Nombre: RED FLAG DIAGNOSTICS GMBH

## IDENTIFICACIÓN

Dirección: Starterzentrum der Uniklinik,  
Gebäude 7, 66424 Homburg, Alemania.C.C. ☐ NIT ☐Nacionalidad o Domicilio: AlemanaC.E. ☐ Otro ☐Lugar de Constitución: Alemania

Cual \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Fax: \_\_\_\_\_

Número \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

REPRESENTANTE  
O APODERADONombre: CARLOS R. OLARTE

## IDENTIFICACIÓN

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 BogotáC.C. ☒ NIT ☐Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799C.E. ☐ Otro ☐E-mail: office@olartemoure.com

Cual \_\_\_\_\_

Número 79.782.747Bta  
TP 74.295INVENTOR (ES)  
(72)Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.Dirección: VER PAGINA ADJUNTANacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

## PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2011/054207Fecha Marzo 21, 2011Publicación Internacional No. WO 2011/113953Fecha Septiembre 22, 2011

6

**Título (54) PROCESO IN VITRO PARA LA DETERMINACIÓN RÁPIDA EN UN  
PACIENTE DEL ESTADO DE INFECCIÓN CON MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.**Clasificación Internacional (51) G01N 33/50; G01N 33/569.

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

EP

(32) Fecha

Marzo 19, 2010

Marzo 19, 2010

(31) Número de Solicitud

61/282,701

10157086.9

9

Comprobante de pago No. 12-

Fecha \_\_\_\_\_

10

**ANEXOS**

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

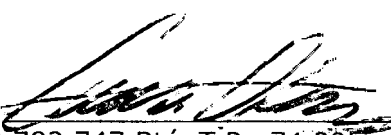
11

**FIGURA CARACTERÍSTICA:**

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:   
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2  
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0083976

Bogotá D.C., Agosto 15 de 2012 - 16:23:28

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR. PAGO     |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|--------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 493223360 | 15/08/2012 | 4.250.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                                   | Vr.UNDITARIO | Vr.CONCEPTO  |
|-------|-------------------------|--------------------------------------------|--------------|--------------|
| 1     | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN | 590.000.00   | 590.000.00   |
|       |                         |                                            |              | \$590.000.00 |

SON: \*\*QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: [www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co) e-mail: [Info@sic.gov.co](mailto:Info@sic.gov.co) Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Agosto 15 de 2012 - 16:23:30

## LISTA DE INVENTORES

PCT/EP2011/054207

**Ferdinand Hermann BAHLMANN**

Großherzog Friedrich Str. 85

66121 Saarbrücken,

Alemania

Nacionalidad: Alemana

**Danilo FLISER**

Handschuhsheimer Landstraße 9/1,

69120 Heidelberg

Alemania

Nacionalidad: Alemana

**Martina SESTER**

Lindenstraße 11,

66424 Homburg

Alemania

Nacionalidad: Alemana

**Urban SESTER**

Lindenstraße 11,

66424 Homburg

Alemania

Nacionalidad: Alemana

|                                                                                                                                                                 |  |                                                |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|------------------------------------------------|------------|
| <div>Industria y Comercio</div> <div>SUPERINTENDENCIA</div>                                                                                                     |  | PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA |            |
|                                                                                                                                                                 |  | RELACIÓN DE ANEXOS                             |            |
| Dependencia:                                                                                                                                                    |  | Fecha: ____/____/____/____<br>AAAA MM DD       | Recorrido: |
| Tipo de Radicación:    Entrada: <input type="checkbox"/> Salida: <input type="checkbox"/> Traslado: <input type="checkbox"/> Convenio: <input type="checkbox"/> |  |                                                |            |
| Radicator:                                                                                                                                                      |  |                                                | Planilla:  |

| ID | No. Radicación | Consecutivo | Item |
|----|----------------|-------------|------|
| 1  | 12-162307      | 0           |      |
| 2  |                |             |      |
| 3  |                |             |      |
| 4  |                |             |      |
| 5  |                |             |      |
| 6  |                |             |      |
| 7  |                |             |      |
| 8  |                |             |      |
| 9  |                |             |      |
| 10 |                |             |      |
| 11 |                |             |      |
| 12 |                |             |      |
| 13 |                |             |      |
| 14 |                |             |      |
| 15 |                |             |      |
| 16 |                |             |      |
| 17 |                |             |      |

| Item | Unidad de Conservación |
|------|------------------------|
| 1    | Bolsa                  |
| 2    | Caja                   |
| 3    | Libro                  |
| 4    | Sobre                  |
| 5    | Tomo                   |
| 6    | Otro                   |
| Item | Soporte Documental     |
| 7    | CD                     |
| 8    | Disquete               |
| 9    | DVD                    |
| 10   | Folleto                |
| 11   | Foto                   |
| 12   | Periódico              |
| 13   | Plano                  |
| 14   | Publicación Periódica  |
| 15   | USB                    |
| 10   | Otro                   |

Observaciones:

DIVERS CO.



No. 12-162307- -00000-0000

Fecha: 2012-09-19 16:38:27

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act: 411 PRESENTACION

Folios: 4

3

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

|                                   |                                                                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una patente.                                             |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud   |
| <input type="checkbox"/>          | Descripción de la invención                                                         |
| <input type="checkbox"/>          | Dibujos de ser estos pertinentes                                                    |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento) |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                 |

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

|                                              |                                                                                                                         |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita una PCT                                                                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen) |
| <input type="checkbox"/>                     | Dibujos de ser estos pertinentes                                                                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)                                     |
| Completa <input checked="" type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                                     |

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                                           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita Diseño industrial                                                              |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud                         |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                                             |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                                                       |

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

|                                   |                                                                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/>          | Indicación que se solicita un esquema de trazado                                  |
| <input type="checkbox"/>          | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud |
| <input type="checkbox"/>          | Representación gráfica de un esquema de trazado                                   |
| <input type="checkbox"/>          | Comprobante de pago de las tasas establecidas                                     |
| Completa <input type="checkbox"/> | Incompleta <input type="checkbox"/>                                               |

(51) International Patent Classification:  
*G01N 33/50* (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)(21) International Application Number:  
PCT/EP2011/054207(22) International Filing Date:  
21 March 2011 (21.03.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
61/282,701 19 March 2010 (19.03.2010) US  
10157086.9 19 March 2010 (19.03.2010) EP(71) Applicant (for all designated States except US): **RED FLAG DIAGNOSTICS GMBH** [DE/DE]; Starterzentrum der Uniklinik, Gebäude 7, 66424 Homburg (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BAHLMANN, Ferdinand Hermann** [DE/DE]; Großherzog Friedrich Str. 85, 66121 Saarbrücken (DE). **FLISER, Danilo** [DE/DE]; Handschuhsheimer Landstraße 9/1, 69120 Heidelberg (DE). **SESTER, Martina** [DE/DE]; Lindenstraße 11, 66424 Homburg (DE). **SESTER, Urban** [DE/DE]; Lindenstraße 11, 66424 Homburg (DE).(74) Agent: **von Kreisler Selting Werner**; Deichmannhaus am Dom, Bahnhofsvorplatz 1, 50667 Köln (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: IN VITRO PROCESS FOR THE QUICK DETERMINATION OF A PATIENT'S STATUS RELATING TO INFECTION WITH MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

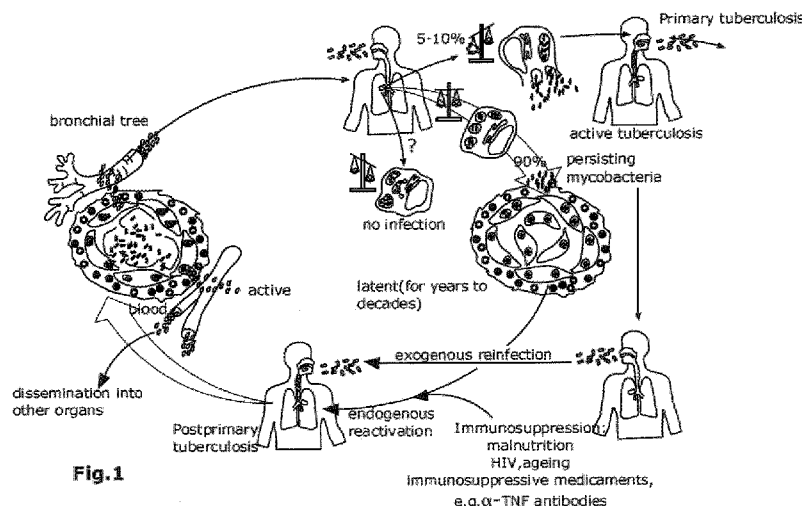


Fig.1

(57) Abstract: An in-vitro process for the quick determination of the infection status of a Mycobacterium tuberculosis infection from whole blood in terms of active or latent tuberculosis, comprising the steps of: • stimulating an antigen-specific T cell that is present in a first sample of whole blood with purified protein derivative (PPD) in the presence of antibodies against CD28, or CD28 and CD49d; • processing of PPD by antigen-presenting cells (APC) by incubating for 1.5 h to 2.5 h, especially for 2 h, at 35 °C to 39 °C, especially at 37 °C, optionally with adding CO<sub>2</sub>; • then adding a secretion inhibitor; • effecting an intensive mixing; and • another incubation for a period of at least 2.5 h at a temperature of from 35 °C to 39 °C, and • determining a cytokine profile from both the intracellular INF-γ production and the intracellular IL-2 production of the antigen-specific T cell; wherein • the presence of an active tuberculosis is indicated by a shift of the cytokine profile towards IFN-γ single positive cells accompanied by a decrease of IFN-γ/IL-2 double positive T cells.

In Vitro Process for the Quick Determination of a Patient's Status  
Relating to Infection with *Mycobacterium tuberculosis*

The present invention relates to in-vitro processes for the quick determination of the infection status of a *Mycobacterium tuberculosis* infection from whole blood.

5 Tuberculosis (TBC) is leading the worldwide statistics of deadly infectious diseases, wherein only about five to ten percent of those infected with *Mycobacterium tuberculosis* will become ill with tuberculosis in the course of their lives (Figure 1). With the direct detection of the pathogen by laboratory diagnostics, the disease is clinically confirmed. By indirect detections with skin tests or an  
10 immunological test, the disease can only insufficiently be clinically diagnosed. Thus, it is currently not possible technically by means of the available diagnostic tests to get reliable information on a short-term basis, i.e., within a few hours, about the infection status of a patient suspected to be infected with tuberculosis.

The diagnosis of tuberculosis is ensured if a detection of the pathogens in culture  
15 is available. However, this is successful without difficulties only if the tuberculous tissue alterations are connected to the bronchial system, the efferent urinary tract or the intestine and can be excreted. Otherwise, it can be tried to obtain material by punctures with needles or directly by sampling tissue. Due to the slow growth of *Mycobacterium tuberculosis* on conventional solid media, in these  
20 cases, it is necessary to wait for four to six weeks to obtain a result, and in liquid cultures, the detection may be successful already after about two weeks with modern detection methods for mycobacterial growth.

In the indirect detection by means of a skin test or immunological detection, for example, in the Mendel-Mantoux intracutaneous tuberculin test, a defined  
25 amount of purified and filtered antigens from mycobacteria (tuberculin) is injected into the epidermis. If the immune system of the tested subject has had contact with mycobacteria before, a defense reaction with immigration of defense cells into the skin occurs at the respective site within three days, resulting in a swelling. This is a type IV reaction according to Coombs. As early  
30 as six weeks after an infection with TBC, the test may become positive. A

- 2 -

palpable induration at the testing site is referred to as a positive reaction. This may mean that a tuberculosis infection has taken place. However, the test does not say anything about the presence of a disease. A positive test reaction is also possible after a tuberculosis vaccination. If the skin remains unchanged at the testing site or only shows a rash, this is considered a negative result. A tuberculosis infection is excluded then with a high probability.

To conclude, the intracutaneous tuberculin test is reliable only in a very limited way. On the one hand, it may remain negative just in severe courses, such as miliary tuberculosis or in immunosuppression, and on the other hand, earlier vaccination or contact with atypical mycobacteria leads to a false positive reaction.

As a further possible diagnostic method, immunological test methods, so-called interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) tests, have also been available since 2005. In this test, defense cells from the blood are stimulated with a mixture of antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. If these cells have been in contact with the pathogens before due to a tuberculosis infection, they form an increased amount of the messenger IFN- $\gamma$ . It can be determined in the cell supernatant, and in blood samples from infected subjects, it is at a clearly higher level than that of a negative control, which is to be carried along. For stimulation, the antigens ESAT-6 (early secreted antigenic target), CFP-10 (culture filtrate protein) and Tb7.7 are employed. They are formed in the early phase of infection and are not produced by most of the so-called non-tuberculosis mycobacteria, nor by the vaccination strains of the mycobacteria used for the BCG vaccination. This explains the very high specificity of the tests between true tuberculosis infections and infections from atypical mycobacteria or immunity acquired by vaccination. Two test systems for the IFN- $\gamma$  test are currently approved in the European Union, namely QuantiFERON-TB<sup>®</sup> Gold In-Tube from Cellestis, which detects IFN- $\gamma$  production by means of ELISA, and the T.SPOT.TB test from Oxford Immunotec, which also detects the number of producing T lymphocytes by means of Elispot in addition to the production of IFN- $\gamma$ . In both tests, blood (QuantiFERON-TB<sup>®</sup> Gold In-Tube) or isolated mononuclear blood cells (T.SPOT.TB) must be incubated with the antigens for 20 hours, so that a test

result is available on the next day at the earliest. The sensitivity of these tests for a past contact with *M. tuberculosis* is stated to range from 82 to 100% in different studies, the specificity in low-risk controls is being stated to be 98%. However, the performance of the tests is associated with difficulties and uncertainties in practice. The time window for the incubation and also the necessary constant temperature of 37 °C give rise to errors, as does the necessary experience with the method in the laboratory itself. Therefore, the stated values for the sensitivity and specificity are not reached by far in practice. As in all examination methods with sensitivities or specificities below 100%, its significance decreases with the prevalence rate of a true infection. Therefore, these in-vitro tests are not suitable for application in populations or occupational groups with a low prevalence either.

Marcia Valeria B.S. Martins et al. reported in Tuberculosis (2007) **87**, 202-211 that the level of PPD-specific IFN- $\gamma$ -producing CD4+ T cells in the blood predicts the *in vivo* response to PPD. Uma Devi Ranganathan et al. disclosed in Vaccine **28** (2010), 152-161 about recombinant pro-apoptotic *Mycobacterium tuberculosis* generating CD8+ T cell responses against HIV type 1 Env and *M. tuberculosis* in neonatal mice. Stefan Winkler et al. reported in Microbes and Infection 7 (2005) 1161-1169 about increased specific T cell cytokine responses in patients with active pulmonary tuberculosis from Central Africa. Corine Bronke et al published in Human immunology **66**, 950-961 (2005) about direct *Ex Vivo* detection of HLA-DR3-restricted cytomegalovirus- and *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4+ T cells. Vernon C. Maino and Louis Picker described intracellular detection of cytokine expression by flow cytometry (Cytometry 34:207-215 (1998). T. Meier et al reported in Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2005) 24: 529-536 about sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. Holden T. Maecker et al. reported in BMC Immunology 2005, 6:13 about standardization of cytokine flow cytometry assays. Maria A. Suni et al. disclose the detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole Blood by flow cytometry (Journal of Immunological Methods 212 (1998) 89-98). Streitz M, et al. reported that tuberculin-specific T-cell responses have low diagnostic specificity in BCG vaccinated populations. While subunit-antigen (e.g. ESAT-6, CFP-10) based tests

are useful for diagnosing latent tuberculosis infection, there is no reliable immunological test for active pulmonary tuberculosis. Notably, all existing immunological tuberculosis-tests are based on T-cell response size, whereas the diagnostic potential of T-cell *response quality* has never been explored. This includes surface marker expression and functionality of mycobacterial antigen specific T-cells ((2007) Loss of Receptor on Tuberculin-Reactive T-Cells Marks Active Pulmonary Tuberculosis. PLoS ONE 2(8): e735 doi:10.1371/journal.pone.0000735).

WO-A-2008/113119 discloses methods and kits for measuring a cell-mediated immune (CMI) in a small volume of whole undiluted blood collected from a subject. In particular, the methods are for measuring responses in undiluted whole blood samples having a volume of, for example, 50µl to 500µl. Thus, capillary sampling and rapid testing of subjects including pediatric, adult or geriatric human subjects are facilitated.

US-A-2001/0006789 discloses a novel approach to the assessment of antigen-specific T cells that quantifies and characterizes these cells with unprecedented clarity, and importantly because it is performed in whole blood, is amenable to routine use in the clinical immunology laboratory. The methodology offers an improved cytometric intracellular cytokine assay in whole blood that can simultaneously measure multiple T cell subsets expressing multiple cytokines from a single whole blood culture. Evaluation of whole blood antigen specific cytokine responses has the important advantage of assessing T cell activation in the presence of ALL types of MHC autologous antigen presenting cells present in the native sample. It also has the advantage of enabling a culture system (whole blood) which can reflect effects of systemic environments (i.e. drug augmentation or suppression) on T cell responses to specific stimuli including antigen, by either culturing in the presence of such drug or analyzing the blood of a human or animal receiving such drug.

It is an object of the present invention to provide a process that avoids the drawbacks of the prior art and offers a quick and reliable diagnostic method that additionally allows distinguishing between an acute infection and a latent infection.

- 5 -

This object is achieved by an in-vitro process for the quick determination of the infection status of a *Mycobacterium tuberculosis* infection from whole blood in terms of active or latent tuberculosis, comprising the steps of:

- 5       • stimulating an antigen-specific T cell that is present in a first sample of whole blood with purified protein derivative (PPD) in the presence of antibodies against CD28, or CD28 and CD49d;
- processing of PPD by antigen-presenting cells (APC) by incubating for 1.5 h to 2.5 h, especially for 2 h, at 35 °C to 39 °C, especially at 37 °C, optionally with adding CO<sub>2</sub>;
- 10     • then adding a secretion inhibitor;
- effecting an intensive mixing; and
- another incubation for a period of at least 2.5 h at a temperature of from 35 °C to 39 °C, and
- 15     • determining a cytokine profile from both the intracellular INF- $\gamma$  production and the intracellular IL-2 production of the antigen-specific T cell; wherein
- the presence of an active tuberculosis is indicated by a shift of the cytokine profile towards IFN- $\gamma$  single positive cells accompanied by a decrease of IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive T cells.

20     In one embodiment of the process according to the invention, another stimulation with PBS, SEB, ESAT-6 CFP-10 and/or vaccination antigen may be effected in addition to said stimulation with PPD. This may be indicated when antigen-specific cells are present in order to decide whether these are due to contact with *Mycobacterium tuberculosis* or due to contact with non-tuberculous mycobacteria or due to a vaccination response.

- 6 -

In another embodiment of the invention, a negative control is performed by adding a buffer, in particular a physiologically acceptable buffer, such as PBS 0.9%NaCl or 5% Glucose to an antigen-specific cell that is present in the whole blood of a second sample, which is authentic with said first sample ("authentic with" meaning "derived from the same source as").

In another embodiment of the invention, a positive control can be performed by adding SEB to an antigen-specific T cell that is present in the whole blood of a third sample, which is authentic with said first sample.

In one embodiment, a vaccination control, in particular a BCG-vaccination control, can be effected by adding ESAT-6 (early secreted antigenic target) and CFP-10 (culture filtrate protein) to an antigen-specific T cell that is present in the whole blood of a fourth sample, which is authentic with said first sample. Alternatively, a control whether or not a contact with non-tuberculosis mycobacteria took place in the whole blood donor can be effected by adding ESAT-6 (early secreted antigenic target) and CFP-10 (culture filtrate protein) to an antigen-specific T cell that is present in the whole blood of a fourth sample, which is authentic with said first sample.

In another embodiment a vaccination control can take place by adding the vaccination antigen to an antigen-specific T-cell that is present in the whole blood of a fifth sample which is authentic with said first sample.

In still another embodiment of the process according to the invention, the secretion inhibitor is selected from the group consisting of brefeldin A, monensin or the like.

According to the invention, the determination of the cytokine profile is effected by means of suitable methods, such as flow cytometry.

The process according to the invention can be applied to whole blood samples from humans or animals.

- 7 -

The process according to the invention is particularly applied for contact tracing wherein whole blood was obtained from a person with close contact to a patient with active TB or suspect to have had a close contact to a patient with active TB. Furthermore, depending on the result of the diagnostic assay of the invention a treatment decision or regime is established as follows:

a. a prophylaxis, such as INH or an active treatment, such as quadruple therapy is indicated in cases, where a shift of the cytokine profile towards IFN- $\gamma$  single positive cells accompanied by a decrease of IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells was detected;

b1. if diagnostic investigations revealed a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* by IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells and no information about previous testing is available, no acute therapy is necessary and the patient has to be retested within 2 to 4 weeks;

b2. if diagnostic investigations revealed a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* by IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells and if in previous testing for latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* did reveal no contact with *Mycobacterium tuberculosis* so far, a prophylaxis, such as INH therapy is indicated;

c1. no acute therapy is indicated if the patient shows no response.

c2. in case the patient reveals any clinical symptoms, retesting is indicated.

The process according to the invention can further be employed to investigate whole blood which was obtained from a person before receiving immunosuppressive drugs or in an immune-incompetent state like HIV infection.

Depending on the result of the diagnostic assay of the invention a treatment decision or regime is established as follows:

a. a prophylaxis, such as INH or an active treatment, such as quadruple therapy, and optionally delaying of immunosuppressive therapy, is indicated in cases, where a shift of the cytokine profile towards IFN- $\gamma$  single positive cells accompanied by a decrease of IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells was detected;

b1. if diagnostic investigations revealed a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* by IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells and no information about

- 8 -

previous testing is available, immunosuppressive therapy is possible and the patient has to be retested within 2 to 4 weeks;

b2. if diagnostic investigations revealed a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* by IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells and if in previous testing for latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* did reveal no contact with *Mycobacterium tuberculosis* so far, a prophylaxis, such as INH therapy, and optionally delaying of immunosuppressive therapy, is indicated as well as retesting of the patient within 2 to 4 weeks;

c1. immunosuppressive therapy is to begin if the patient shows no response;

c2. in case the patient reveals any clinical symptoms, retesting is indicated.

The process according to the invention can further be employed to investigate whole blood which was obtained from a person suspected for an active TB infection.

Depending on the result of the diagnostic assay of the invention a treatment decision or regime is established as follows:

a. an active treatment, such as a quadruple therapy is indicated in cases, where a shift of the cytokine profile towards IFN- $\gamma$  single positive cells accompanied by a decrease of IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells was detected;

b1. if diagnostic investigations revealed an latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* by IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells and no information about previous testing is available, an acute infection is unlikely, an alternative diagnosis is to be considered, and the patient has to be retested within 2 to 4 weeks;

b2. if diagnostic investigations revealed a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* by IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells and if in previous testing for latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* did reveal no contact with *Mycobacterium tuberculosis* so far, a prophylaxis, such as INH or an active treatment, such as quadruple therapy is indicated and the patient has to be retested within 2 to 4 weeks;

c1. no acute therapy is indicated if the patient shows no response;

c2. in case the patient reveals any clinical symptoms, retesting is indicated.

Figure 1 depicts the infection cycle of *M. tuberculosis*.

Figure 2 shows a flow-cytometric analysis of the antigen-specific T cells, which were identified merely by the analysis of the cytokine IFN- $\gamma$ . It was found that a distinction between an active tuberculosis (A-TB) and a successfully treated tuberculosis (T-TB) is not possible by the sole analysis of IFN- $\gamma$  independently of the stimulation with PPD, ESAT-6 or CFP-10. ESAT-6 and CFP-10 only allow for a discrimination between patients having had contact with *M. tuberculosis* (ESAT-6 and/or CFP-10 positive) and patients with a pure BCG vaccination response (ESAT-6 and CFP-10 negative, not shown).

Figure 3 shows the frequency distribution of PPD-specific T cells in patients with active tuberculosis (A-TB) and subjects with successfully treated tuberculosis (T-TB). The T cells were identified by the activation via CD69 and the specific induction of IFN- $\gamma$  by PPD. It is found that although patients with A-TB have significantly higher frequencies of PPD-specific T cells, a distinction between an active tuberculosis (A-TB) and a successfully treated tuberculosis (T-TB) is not possible by the sole analysis of IFN- $\gamma$  in the individual case due to the large overlap.

Figure 4 exemplarily shows IFN- $\gamma$ /IL-2 cytokine profiles of PPD-reactive T cells in four patients with successfully treated tuberculosis. The percentages of IFN- $\gamma$  single positive, IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive and IL-2 single positive T cells is quantified in the Figure on the left side. The predominant proportion of the cells expresses both cytokines.

Figure 5 exemplarily shows IFN- $\gamma$ /IL-2 cytokine profiles of PPD-reactive T cells in four patients with active tuberculosis. The percentages of IFN- $\gamma$  single positive, IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive and IL-2 single positive T cells is quantified in the Figure on the right-hand side. Patients with active tuberculosis exhibit a shift in the cytokine profile towards IFN- $\gamma$  single positive cells accompanied by a decrease of IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive T cells.

- 10 -

Figure 6 shows a summarized representation of the cytokine profiles in patients with active tuberculosis (A-TB) and successfully treated tuberculosis (T-TB). The dashed line represents the limit of IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive T cells (56%) below which an active tuberculosis can be diagnosed with a specificity of 100% and a sensitivity of 70%. This limit was established by means of receiver operating characteristic (ROC) analysis.

The invention is further explained by means of the following Examples.

Advantageously, the INF- $\gamma$  production of the antigen-specific cell is determined intracellularly in the process according to the invention. Thus, the stimulation time of the antigen-specific T cells with the tuberculosis antigens PPD (purified protein derivative), ESAT-6 (early secreted antigenic target) and CFP-10 (culture filtrate protein) can be shortened to 6 hours in contrast to the 20 hours of the previous tests (Figure 2). Although the determination of INF- $\gamma$  expressing PPD-reactive T cells already occurs at a statistically significant higher frequency in patients with active tuberculosis as compared to patients with latent or successfully treated tuberculosis, a distinction between the two stages of the disease cannot be made for the individual patient due to a very large overlap range (Figure 3). ESAT-6 and CFP-10 merely allow for the discrimination between patients having had contact with *M. tuberculosis* (ESAT-6 or CFP-10 positive) and patients with a pure BCG vaccination response (ESAT-6 and CFP-10 negative, not shown). However, the distinction between active and latent or successfully treated tuberculosis is enabled through the activation via CD69 in PPD-specific T cells and by the simultaneous determination of INF- $\gamma$  and interleukin-2 (IL-2). While the predominant fraction of the PPD-reactive T cells express both INF- $\gamma$  and IL-2 in latent or successfully treated tuberculosis (Figure 4), the cytokine profile will shift towards INF- $\gamma$  single positive cells in active tuberculosis (Figure 5). By means of receiver operating characteristic (ROC) analysis, the limit of IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive PPD-reactive T cells below which an active tuberculosis can be diagnosed with a specificity of 100% is established. In the population present here, this limit is 56% of IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive T cells, patients with active tuberculosis (A-TB) can be distinguished thereby from

- 11 -

patients with successfully treated tuberculosis (T-TB) with a sensitivity of 70% (Figure 6).

In another embodiment, the determination of the cytokine profile is effected by means of flow cytometry with labeled antibodies. Thus, in addition to the determination of INF- $\gamma$ , the simultaneous quantification of further functionally relevant surface molecules, such as PD-1 (programmed death-1), CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), TIM-3 (T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3), or further cytokines, such as interleukin-2, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) or IP-10 (chemokine (C-X-C motif) ligand 10) is also possible.

For the analysis of antigen-specific CD4 T cells by means of flow cytometry, specific T cells are excited by antigen stimulation to activation and cytokine production, and the number of excited cells is subsequently detected by means of specific antibodies. For the examination of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) specific T cells, the antigens PPD, ESAT-6 and CFP-10 are employed. For the distinction of active from latent/successfully treated tuberculosis, a test with PPD is performed, and for the differentiation of a latent/successfully treated tuberculosis infection from a previous vaccination, a test with ESAT-6 and CFP-10 is performed. PBS serves as a negative control, by which background signals, such as non-specifically responding T cells, can be established. SEB serves as a positive control.

The stimulation can be performed directly from whole blood. At first, the whole blood is mixed with CD28- and CD49d-specific antibodies at a concentration of 1  $\mu\text{g/ml}$  each and admixed with the respective antigens (PPD: 7.32  $\mu\text{g/ml}$ , tuberculin RT-50; Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark), Stimulations were performed with *Mtb*-derived peptide pools covering ESAT-6 and CFP-10. CFP-10 and ESAT-6 peptides pools are composed of 15-mers overlapping by 11 amino acids, and all peptides were HPLC purified [ $>80\%$  purity, Hariri et al. *Nature Medicine* 2011;**17**: 372–376].

- 12 -

After 2 hours of incubation time (37 °C, 6% CO<sub>2</sub>), the exocytosis of the cytokines induced by the stimulation is stopped by the addition of 10 µg/ml brefeldin A (BFA) in order to accumulate the cytokines intracellularly. This is followed by another 4 hours of incubation (37 °C, 6% CO<sub>2</sub>).

- 5 The stimulation is interrupted after 6 hours, and the cells are fixed. At first, 2 mM EDTA is added to each sample, followed by mixing for 10 seconds and incubating at room temperature for 15 minutes. The fixation of the white blood cells and lysis of the erythrocytes is effected with 9 ml of Becton Dickinson lysing solution per milliliter of whole blood for an incubation time of 10 minutes at
- 10 room temperature. After centrifugation and suction of the supernatant, the cell pellet obtained is washed with 2 ml of FACS buffer (PBS-5 FCS-0.5% BSA-0.07% NaN<sub>3</sub>). This is effected by adding the FACS buffer, followed by centrifuging and suction of the supernatant. Finally, the fixed cells are taken up in FACS buffer. The cells can now be stained directly or stored in the refrigerator at 4 °C over
- 15 night. To stain the stimulated cells with specific fluorochrome-labeled antibodies, the cells are redistributed to FACS tubes. Leucocytes from about 225-300 µl of whole blood are used per staining mixture. At first, 2 ml of saponin buffer (FACS buffer/0.1% saponin) is added per sample for 10 min. After centrifugation and suction of the SAP buffer, the addition of the antibody mixture is effected in a
- 20 total volume of 50 µl each per sample of FACS buffer/0.1% saponin (anti-CD4 clone SK3, anti-IFN-γ clone 4S.B3, anti-IL-2 clone MQ1-17H12, and anti-CD69 clone L78). Since the antibodies are light-sensitive, the 30 min incubation is effected in the dark at room temperature. Subsequently, the cells are washed with 3 ml of FACS buffer to remove unbound antibodies. Finally, the cell pellet is
- 25 taken up in 150 µl of 1% paraformaldehyde solution and analyzed by means of flow cytometry.

- In successfully treated tuberculosis, it is found that a predominant fraction of antigen-specific T cells express both IFN-γ and IL-2 upon specific stimulation with PPD. Surprisingly, when an active tuberculosis exists, the cytokine profile
- 30 will shift towards IFN-γ single positive cells accompanied by a simultaneous decrease of IFN-γ/IL-2 double positive T cells. A latent or successfully treated tuberculosis infection can be distinguished from a vaccination response by

- 13 -

stimulation with ESAT-6 and CFP-10. ESAT-6 and CFP-10 allow discriminating between patients having had contact with *M. tuberculosis* (ESAT-6 and/or CFP-10 positive) and patients with a pure BCG vaccination response (ESAT-6 and CFP-10 negative).

C L A I M S :

1. An in-vitro process for the quick determination of the infection status of a *Mycobacterium tuberculosis* infection from whole blood in terms of an active or latent tuberculosis, comprising the steps of:
  - 5       • stimulating an antigen-specific T cell that is present in a first sample of whole blood with purified protein derivative (PPD) in the presence of antibodies against CD28, or CD28 and CD49d;
  - 10       • processing of PPD by antigen-presenting cells (APC) by incubating for 1.5 h to 2.5 h, especially for 2 h, at 35 °C to 39 °C, especially at 37 °C, optionally with adding CO<sub>2</sub>;
  - then adding a secretion inhibitor;
  - effecting an intensive mixing; and
  - another incubation for a period of at least 2.5 h at a temperature of from 35 °C to 39 °C, and
  - 15       • determining a cytokine profile from both the intracellular INF- $\gamma$  production and the intracellular IL-2 production of the antigen-specific T cell; wherein
  - the presence of an active tuberculosis is indicated by a shift of the cytokine profile towards IFN- $\gamma$  single positive cells accompanied by a decrease of IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive T cells.
  - 20
2. The process according to claim 1, wherein another stimulation with SEB, ESAT-6 and CFP-10 and/or vaccination antigen is effected in addition to said stimulation with PPD.
3. The process according to claim 1 or 2, wherein a negative control is  
25 performed by adding a physiological buffer such as PBS 0.9%NaCl or 5%

- 15 -

Glucose to an antigen-specific T cell that is present in the whole blood of a second sample, which is authentic with said first sample.

4. The process according to at least one of claims 1 to 3, wherein a positive control is performed by adding SEB to an antigen-specific T cell that is present in the whole blood of a third sample, which is authentic with said first sample.

5. The process according to at least one of the claims 1 to 4 wherein a vaccination control took place by adding the vaccination antigen to an antigen-specific T-cell that is present in the whole blood of a fourth sample which is authentic with said first sample.

6. The process according to at least one of claims 1 to 5, wherein a BCG-vaccination control is effected by adding ESAT-6 (early secreted antigenic target) and CFP-10 (culture filtrate protein) to an antigen-specific T cell that is present in the whole blood of a fourth sample, which is authentic with said first sample.

7. The process according to at least one of claims 1 to 6 wherein a control whether or not a contact with non-tuberculosis mycobacteria took place in the whole blood donor is effected by adding ESAT-6 (early secreted antigenic target) and CFP-10 (culture filtrate protein) to an antigen-specific T cell that is present in the whole blood of a fifth sample, which is authentic with said first sample.

8. The process according to at least one of claims 1 to 7, wherein said secretion inhibitor is selected from the group consisting of brefeldin A, monensin or the like.

9. The process according to at least one of claims 1 to 8, wherein the determination of the cytokine profile is effected by flow cytometry.

- 16 -

10. The process according to at least one of claims 1 to 9, wherein the whole blood of the samples is derived from humans or animals.
11. The process according to at least one of claims 1 to 10 applied for contact tracing wherein whole blood was obtained from a person with close contact to a patient with active TB or suspect to have had a close contact to a patient with active TB.
12. The process according to claim 11 wherein a treatment decision is made as follows:
  - a. a prophylaxis, such as INH, or an active therapy, such as quadruple therapy, is indicated in cases, where a shift of the cytokine profile towards IFN- $\gamma$  single positive cells accompanied by a decrease of IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells was detected;
  - b1. if diagnostic investigations revealed a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* by IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells and no information about previous testing is available, no acute therapy is necessary and the patient has to be retested within 2 to 4 weeks;
  - b2. if diagnostic investigations revealed a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* by IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells and if in previous testing for latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* did reveal no contact with *Mycobacterium tuberculosis* so far, a prophylaxis, such as INH therapy is indicated;
  - c1. no acute therapy is indicated if the patient shows no response.
  - c2. in case the patient reveals any clinical symptoms, retesting is indicated.

- 17 -

13. The process according to claim 1 to 10 wherein whole blood was obtained from a person before receiving immunosuppressive drugs or in an immune-incompetent state like HIV infection.
14. The process of claim 13 wherein a treatment decision is made as follows:
- 5 a. a prophylaxis, such as INH or an active treatment, such as quadruple therapy, and optionally delaying of immunosuppressive therapy, is indicated in cases, where a shift of the cytokine profile towards IFN- $\gamma$  single positive cells accompanied by a decrease of IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells was detected;
- 10 b1. if diagnostic investigations revealed a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* by IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells and no information about previous testing is available, immunosuppressive therapy is possible and the patient has to be retested within 2 to 4 weeks;
- 15 b2. if diagnostic investigations revealed a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* by IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells and if in previous testing for latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* did reveal no contact with *Mycobacterium tuberculosis* so far, a prophylaxis, such as INH therapy, and optionally delaying of immunosuppressive therapy, is indicated as well as retesting of the patient within 2 to 4 weeks;
- 20 c1. immunosuppressive therapy is to begin if the patient shows no response;
- c2. in case the patient reveals any clinical symptoms, retesting is indicated.
- 25 15. The process according to claim 1 to 10, wherein whole blood was obtained from a person suspected for an active TB infection.

- 18 -

16. The process of claim 15 wherein a treatment decision is made as follows:

a. an active treatment, such as quadruple therapy is indicated in cases, where a shift of the cytokine profile towards IFN- $\gamma$  single positive cells accompanied by a decrease of IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells was detected;

b1. if diagnostic investigations revealed an latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* by IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells and no information about previous testing is available, an acute infection is unlikely, an alternative diagnosis is to be considered, and the patient has to re-tested within 2 to 4 weeks;

b2. If diagnostic investigations revealed a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* by IFN- $\gamma$ /IL-2 double positive cells and if in previous testing for latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* did reveal no contact with *Mycobacterium tuberculosis* so far, a prophylaxis, such as INH or an active treatment, such as quadruple therapy is indicated and the patient has to be retested within 2 to 4 weeks;

c1. no acute therapy is indicated if the patient shows no response;

c2. in case the patient reveals any clinical symptoms, retesting is indicated.

-1/6-

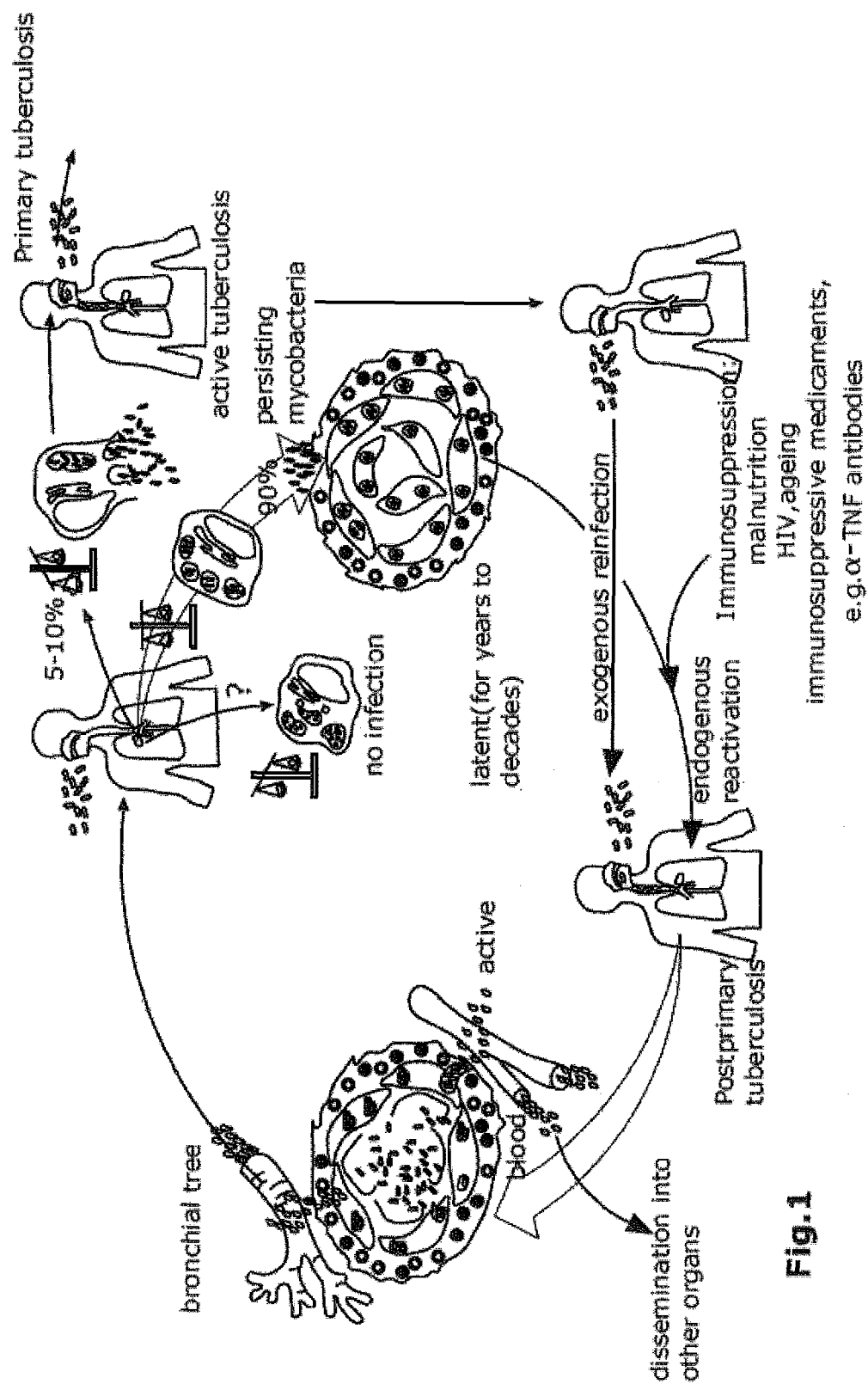
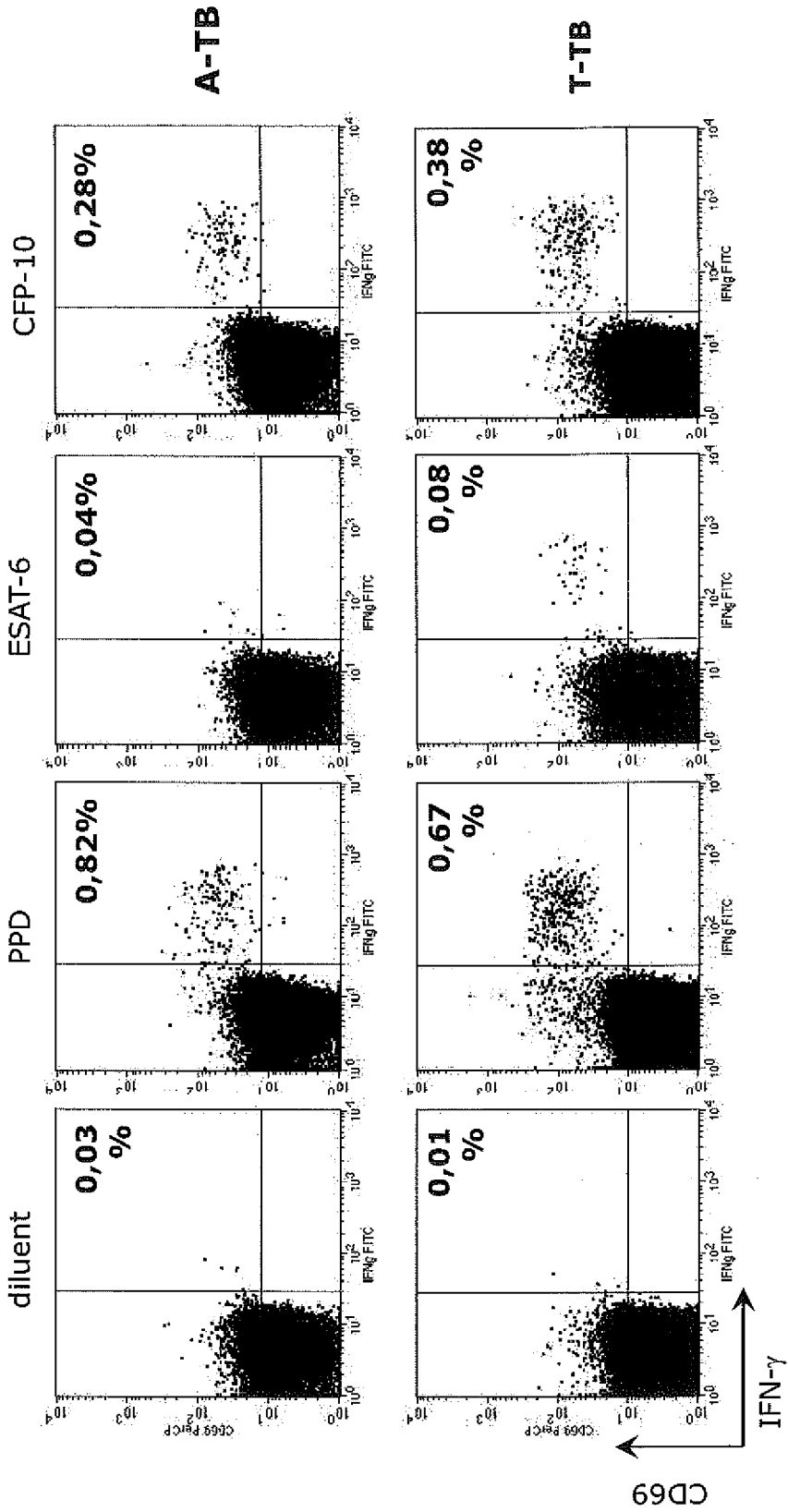


**Fig.1**

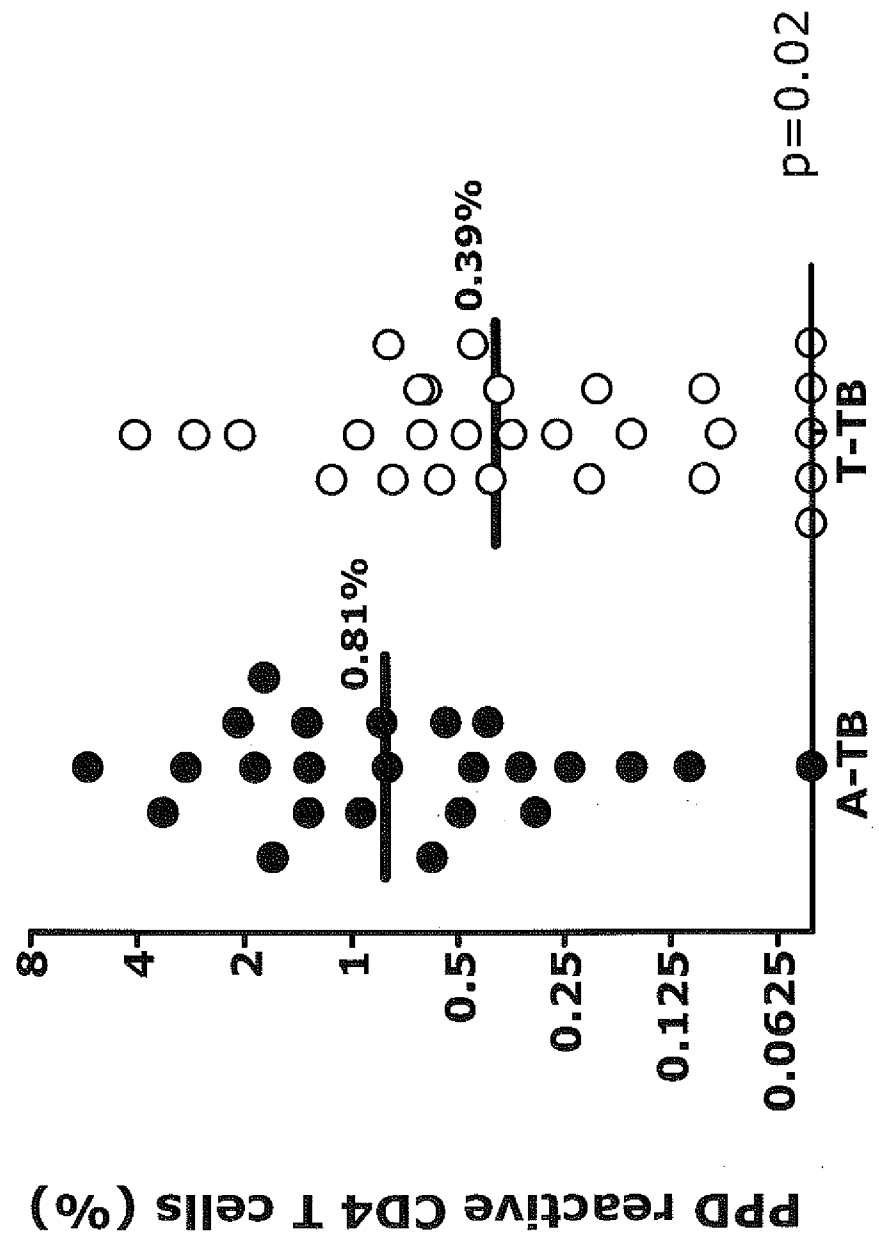
-2/6-

Fig. 2



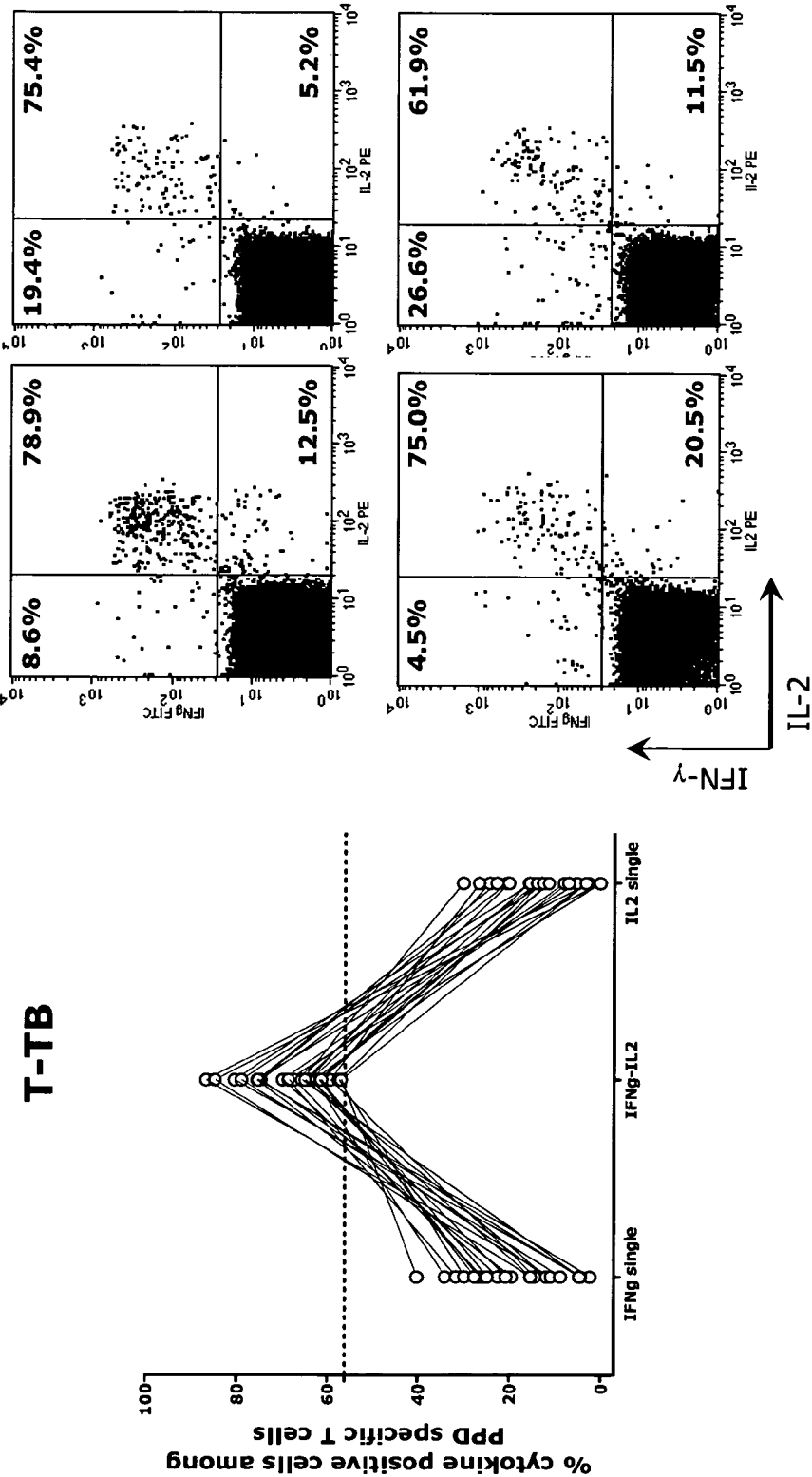
-3/6-

Fig. 3



-4/6-

Fig. 4



-5/6-

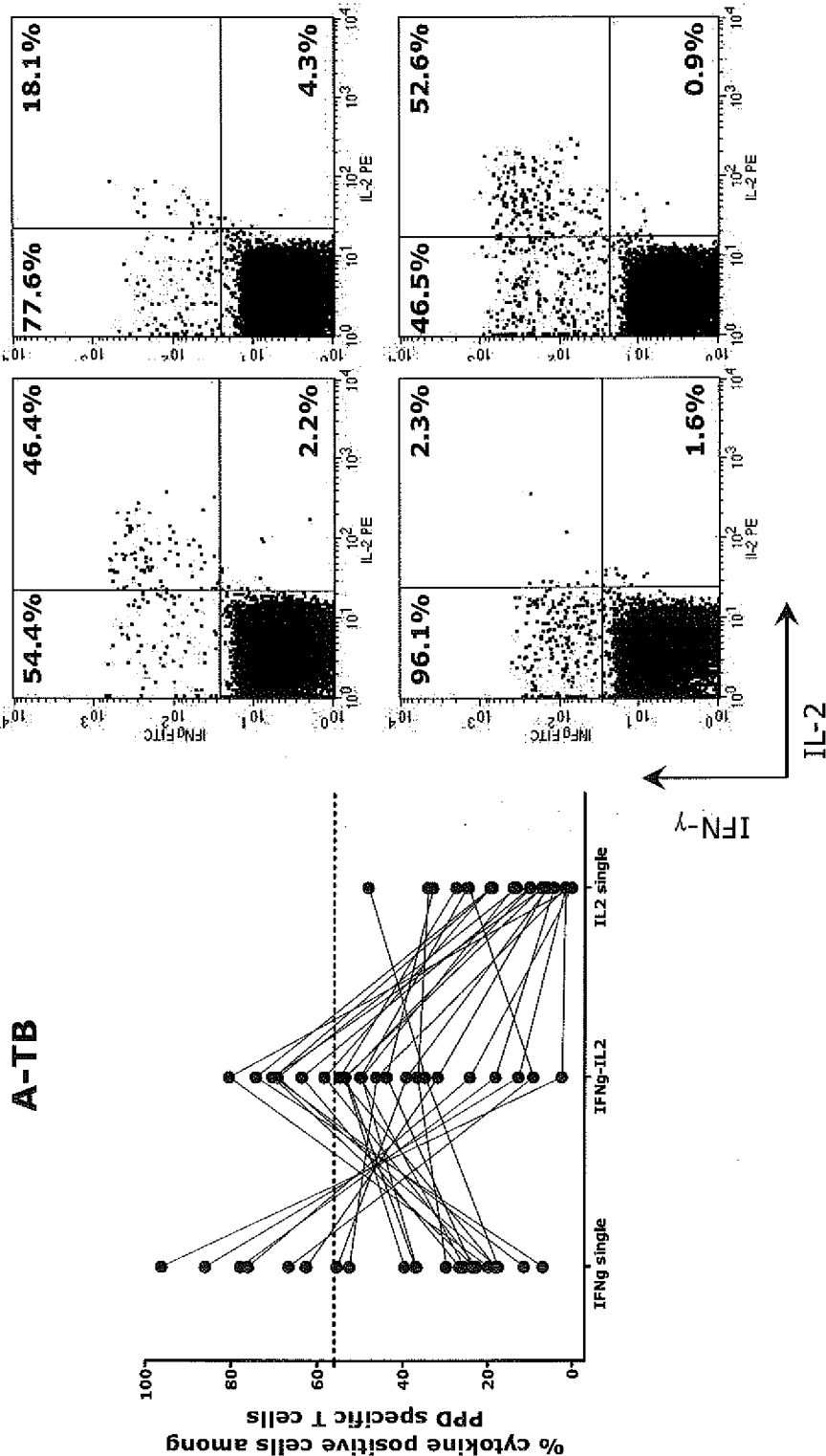
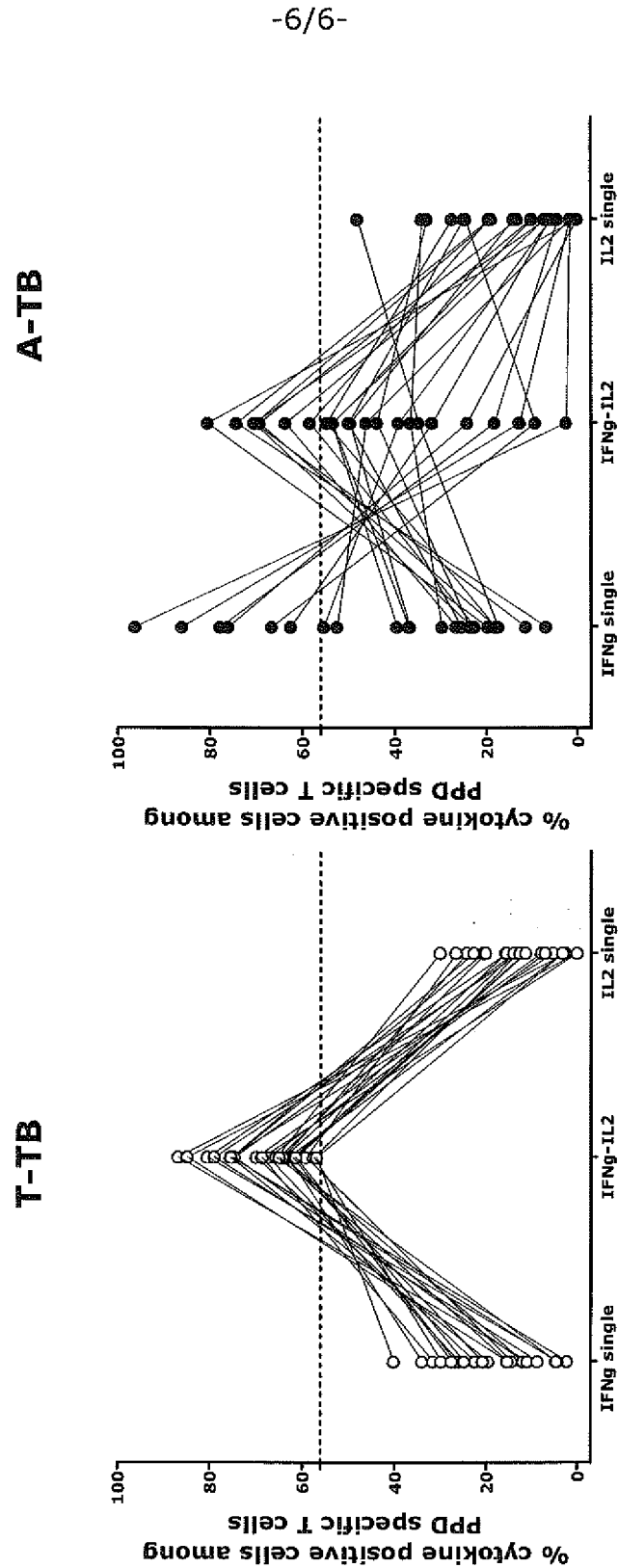


Fig. 5

Fig. 6



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/054207

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/50 G01N33/569  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | <p>SARGENTINI VALERIA ET AL: "Cytometric detection of antigen-specific IFN-gamma/IL-2 secreting cells in the diagnosis of tuberculosis.", BMC INFECTIOUS DISEASES, vol. 9, 99, 2009, pages 1-10, XP002631778, ISSN: 1471-2334<br/>the whole document</p> <p>-----<br/>-/--</p> | 1-10                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 April 2011

Date of mailing of the international search report

06/07/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hinchliffe, Philippe

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/054207

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                        | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | MILLINGTON KERRY A ET AL: "Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load",<br>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 178, no. 8,<br>15 April 2007 (2007-04-15), pages 5217-5226, XP002448599,<br>ISSN: 0022-1767<br>the whole document<br>----- | 1-10                  |
| T         | SESTER URBAN ET AL: "Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active States.",<br>PLOS ONE,<br>vol. 6, no. 3, E17813, 2011, pages 1-7, XP002631779,<br>ISSN: 1932-6203<br>abstract<br>-----                                                                       | 1-10                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2011/054207

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-10

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-10

A method for the determination of TB infection status in an individual based upon pre-stimulation of a blood sample followed by flow cytometry wherein active TB is diagnosed by a particular profile.

---

2. claims: 11, 12

The process of claim 1 used for contact tracing and therapy.

---

3. claims: 13, 14

The process of claim 1 using immunosuppressed persons samples and therapy.

---

4. claims: 15, 16

The process of claim 1 wherein the blood sample comes from a person suspected of having an active TB infection and therapy.

---

**PROCESO IN VITRO PARA LA DETERMINACIÓN RÁPIDA EN UN PACIENTE DEL ESTADO DE INFECCIÓN CON *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

La presente invención se relaciona con procesos in-vitro para la determinación rápida del estado de infección de una infección por *Mycobacterium tuberculosis* en sangre completa.

La tuberculosis (TBC) encabeza las estadísticas mundiales de enfermedades infecciosas mortales, en donde tan solo entre un cinco y diez por ciento aproximadamente de los individuos que están infectados con *Mycobacterium tuberculosis* se enfermarán de tuberculosis en el transcurso de sus vidas (Figura 1). Con la detección directa del patógeno mediante diagnóstico de laboratorio, la enfermedad se confirma clínicamente. Las detecciones indirectas con pruebas de piel o con una prueba inmunológica, la enfermedad solo puede diagnosticarse clínicamente de manera insuficiente. Por consiguiente, con las pruebas de diagnóstico disponibles actualmente no es posible técnicamente obtener información confiable en una base de plazo corto, es decir, en unas pocas horas, acerca del estado de infección de un paciente sospechado de estar infectado con tuberculosis.

El diagnóstico de tuberculosis es seguro si se encuentra disponible la detección de los patógenos en cultivo. Sin embargo, esto solamente resulta un éxito sin dificultades si las alteraciones del tejido tuberculoso se relacionan con el sistema bronquial, el tracto urinario

eferente o el intestino y puedan excretarse. De lo contrario, se puede intentar obtener material por punción con agujas o directamente mediante el muestreo de tejido. Debido al crecimiento lento de *Mycobacterium tuberculosis* en medios sólidos convencionales, en estos casos, es necesario esperar durante cuatro a seis semanas para obtener un resultado, y en cultivos líquidos, la detección puede tener éxito después de tan solo dos semanas con los métodos de detección modernos del crecimiento de micobacterias.

En la detección indirecta por medio de una prueba de piel o detección inmunológica, p.ej., en la prueba intradérmica de tuberculina de Mendel-Mantoux, se inyecta una cantidad definida de antígenos purificados y filtrados de micobacterias (tuberculina) en la epidermis. Si el sistema inmune del sujeto de prueba ha estado en contacto con micobacterias antes, se produce una reacción de defensa con la migración de células de defensa en la piel en el sitio correspondiente dentro de los tres días, resultando en un hinchamiento. Esta es una reacción de tipo IV según Coombs. Tan pronto como seis semanas después de una infección con TBC, la prueba puede dar positivo. Una induración palpable en el sitio de la prueba se conoce como una reacción positiva. Esto significaría que tuvo lugar una infección de tuberculosis. Sin embargo, la prueba no dice nada acerca de la presencia de una enfermedad. Una reacción de prueba positiva también es posible después de una vacunación de tuberculosis. Si la piel se mantiene sin cambios en el

sitio de prueba o sólo muestra una erupción, esto se considera un resultado negativo. Entonces se excluye una infección de tuberculosis con gran probabilidad.

En conclusión, la prueba de tuberculina intracutánea solamente es confiable de una manera muy limitada. Por un lado, puede permanecer negativa sólo en cursos severos, tales como la tuberculosis miliar o en la inmunosupresión, y por otra parte, una vacunación más temprana o el contacto con micobacterias atípicas conduce a una reacción falsa positiva.

Como un posible método de diagnóstico adicional, desde 2005 también existen los métodos de prueba inmunológicos, las pruebas denominadas de gamma-interferón (IFN- $\gamma$ ). En esta prueba, se estimulan las células de defensa de la sangre con una mezcla de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*. Si estas células estuvieron en contacto con los patógenos con anterioridad debido a una infección por tuberculosis, forman una mayor cantidad de IFN- $\gamma$  mensajero. Se puede determinar en el sobrenadante celular, y en las muestras de sangre de sujetos infectados claramente está presente a un nivel más alto que en un control negativo, que se obtendrá conjuntamente. Para la estimulación, se emplean los antígenos ESAT-6 (blanco antigénico de secreción temprana), CFP-10 (proteínas de filtrado de cultivo) y Tb7.7. Se forman en la fase de infección temprana y no son producidos por la mayoría de las denominadas micobacterias no tuberculósicas ni por las cepas de vacunación

de las micobacterias usadas para las vacunas de BCG. Esto explica la especificidad muy elevada de las pruebas entre infecciones de tuberculosis verdaderas e infecciones de micobacterias atípicas o inmunidad adquirida por vacunación. Actualmente existen dos sistemas de prueba aprobados para la prueba de IFN- $\gamma$  en la Unión Europea, la prueba QuantiFERON-TB<sup>®</sup> Gold In-Tube de Cellestis, que detecta producción de IFN- $\gamma$  por medio de un ELISA, y la prueba T.SPOT.TB de Oxford Immunotec, que también detecta la cantidad de linfocitos T productoras por medio de Elispot además de la producción de IFN- $\gamma$ . En ambas pruebas, se debe incubar sangre (QuantiFERON-TB<sup>®</sup> Gold In-Tube) o células sanguíneas mononucleares aisladas (T.SPOT.TB) con los antígenos por 20 horas, de modo que el resultado de la prueba estará disponible al día siguiente como más pronto. Se ha establecido en diferentes estudios que la sensibilidad de estas pruebas para un contacto anterior con *M. tuberculosis* varía en un rango de entre 82 y 100%, estableciéndose la especificidad en controles de bajo riesgo en un 98%. Sin embargo, el rendimiento de las pruebas está asociado con dificultades e incertidumbre en la práctica. La ventana de tiempo para la incubación y también la temperatura constante necesaria de 37°C da lugar a error, así como la experiencia necesaria con el método en el propio laboratorio. Por ello, no se alcanzan por mucho los valores establecidos para la sensibilidad y especificidad en la práctica. Como en todos los métodos examen con sensibilidades o especi-

ficidades inferiores al 100%, su significancia disminuye con el índice de prevalencia de una infección verdadera. Por lo tanto, estas pruebas in-vitro no son adecuadas para su aplicación en poblaciones o tampoco en grupos de ocupación con una prevalencia baja.

Marcia Valeria B.S. Martins et al. informaron en *Tuberculosis* (2007) **87**, 202-211 que el nivel de células T CD4+ productoras de IFN- $\gamma$  específicas de PPD en la sangre predice la respuesta *in vivo* a PPD. Uma Devi Ranganathan et al. divulgaron en *Vaccine* **28** (2010), 152-161, un *Mycobacterium tuberculosis* pro-apoptótico recombinante generador de respuestas de células T CD8+ contra HIV tipo 1 Env y *M. tuberculosis* en ratones neonatos. Stefan Winkler et al. informaron en *Microbes and Infection* 7 (2005) 1161-1169, un aumento de respuestas de citoquinas de células T específicas en pacientes con tuberculosis pulmonar activa de África Central. Corine Bronke et al publicaron en *Human immunology* **66**, 950-961, (2005), la detección directa *Ex Vivo* de células T CD4+ específicas de *Mycobacterium tuberculosis* y citomegalovirus restringidas en HLA-DR3. Vernon C. Maino y Louis Picker describieron la detección intracelular de expresión de citoquinas por citometría de flujo (*Cytometry* 34: 207-215 (1998). T. Meier et al. informaron en *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2005) 24: 529-536, acerca de la sensibilidad de un nuevo ensayo de *immunospot* ligado a enzima comercial (T SPOT-TB) para el diagnóstico de tuberculosis en la práctica clínica. Holden

T. Maecker et al. informaron en *BMC Immunology* 2005, 6: 13, la normalización de ensayos de citoquinas por citometría de flujo. Maria A. Suni et al. divulgan la detección de expresión de citoquinas en células T específica del antígeno en sangre completa por citometría de flujo (*Journal of Immunological Methods*, 212 (1998) 89-98). Streitz M, et al. informaron que las respuestas de células T específicas de tuberculinas tienen una baja especificidad de diagnóstico en poblaciones vacunadas con BCG. Aunque las pruebas basadas en subunidades de antígeno (por ejemplo ESAT-6, CFP-10) son de utilidad para el diagnóstico de una infección de tuberculosis latente, no existen pruebas inmunológicas confiables para una tuberculosis pulmonar activa. Notablemente, todas las pruebas para tuberculosis inmunológicas existentes se basan en la magnitud de respuestas de células T, en tanto nunca se ha explorado el potencial de diagnóstico de la calidad de respuestas de células. Esto incluye expresión de marcadores de la superficie y funcionalidad de células T específicas de antígenos micobacterianos ((2007) *Loss of Receptor on Tuberculin-Reactive T-Cells Marks Active Pulmonary Tuberculosis*. PLoS ONE 2(8):e735 doi:10.1371/journal.pone.0000735).

En WO-A-2008/113119 se divulgan métodos y conjuntos de elementos para medir una respuesta inmune mediada por células (CMI) en un volumen pequeño de sangre completa no diluida recolectada de un sujeto. En particular, los métodos sirven para medir respuestas en muestras de sangre completa

no diluida que tienen un volumen de, p.ej., entre 50  $\mu$ l y 500  $\mu$ l. Por consiguiente, se facilita la toma de muestras en capilares y la evaluación rápida de los sujetos incluyendo sujetos humanos pediátricos, adultos o geriátricos.

En US-A-2001/0006789 se divulga un nuevo enfoque para la evaluación de células T específicas de antígenos que permite cuantificar y caracterizar estas células con una claridad sin precedentes y, más importante aún porque se realiza en sangre completa, es factible emplearlo rutinariamente en laboratorios de inmunología clínica. La metodología ofrece un ensayo citométrico para citoquinas intracelular mejorada en sangre completa que puede medir simultáneamente múltiples subconjuntos de células T que expresan múltiples citoquinas a partir de un solo cultivo de sangre completa. La evaluación de las respuestas de citoquinas específicas de antígenos en sangre completa tiene la importante ventaja de evaluar la activación de células T en la presencia de todos los tipos de células presentadoras de antígenos autólogas MHC presentes en la muestra nativa. También ofrece la ventaja de permitir un sistema de cultivo (sangre completa) que puede reflejar los efectos de los entornos sistémicos (es decir, aumento o supresión de drogas) sobre las respuestas de células T a estímulos específicos incluyendo antígenos, ya sea por cultivo en la presencia de dicha droga o analizando la sangre de un ser humano o animal que recibe dicha droga.

Un objeto de la presente invención comprende

proporcionar un proceso que evita las desventajas del arte anterior y ofrecer un método de diagnóstico rápido y confiable que además permite diferenciar una infección aguda de una infección latente.

Este objeto se logra mediante un proceso in-vitro para la determinación rápida del estado de infección de una infección por *Mycobacterium tuberculosis* a partir de sangre completa en términos de una tuberculosis activa o latente, que comprende los pasos de:

- estimular una célula T específica del antígeno presente en una primera muestra de sangre completa con derivado de proteínas purificado (PPD) en la presencia de anticuerpos contra CD28 o CD28 y CD49d;
- procesar el PPD por células presentadoras de antígenos (APC) por incubación durante 1,5 h a 2,5 h, en especial durante 2 h, a 35°C - 39°C, en especial a 37°C, opcionalmente con adición de CO<sub>2</sub>;
- luego agregar un inhibidor de la secreción;
- realizar un mezclado exhaustivo; y
- incubar adicionalmente por un período de al menos 2,5 h a una temperatura de entre 35°C y 39°C, y
- determinar el perfil de citoquinas a partir de la producción de INF- $\gamma$  intracelular y la producción de IL-2 intracelular de la célula T específica del antígeno; en donde
- la presencia de una tuberculosis activa está indicada por un cambio en el perfil de citoquinas para células

IFN- $\gamma$  simples positivas acompañado por una disminución de células T IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles.

En una forma de realización del proceso de acuerdo con la invención, se puede efectuar otra estimulación con PBS, SEB, ESAT-6 CFP-10 y/o antígeno de vacunación además de dicha estimulación con PPD. Esto puede estar indicado cuando hay células específicas de antígenos con el fin de decidir si se deben al contacto con *Mycobacterium tuberculosis* o si se deben al contacto con micobacterias no tuberculósicas o a una respuesta de vacunación.

En otra forma de realización de la invención, se obtiene un control negativo por adición de una solución amortiguadora, en particular una solución amortiguadora fisiológicamente aceptable, tal como PBS 0,9% NaCl o 5% de glucosa a una célula específica del antígeno presente en la sangre completa de una segunda muestra, que es auténtica con respecto a dicha primera muestra (donde "auténtica con" significa "derivada de la misma fuente que").

En otra forma de realización de la invención, se obtiene un control positivo por adición de SEB a una célula T específica del antígeno presente en la sangre completa de una tercera muestra, que es auténtica con respecto a dicha primera muestra.

En una forma de realización, se puede efectuar una vacunación control, en particular un control de vacunación de BCG, por adición de ESAT-6 (blanco antigénico de secreción temprana) y CFP-10 (proteínas de filtrado de

cultivo) a una célula T específica del antígeno presente en la sangre completa de una cuarta muestra, que es auténtica con respecto a dicha primera muestra. Como alternativa, un control ya sea si estuvo o no en contacto con micobacterias que no son de tuberculosis en la sangre completa donante se condujo por adición de ESAT-6 (blanco antigénico de secreción temprana) y de CFP-10 (proteínas de filtrado de cultivo) a una célula T específica del antígeno presente en la sangre completa de una quinta muestra, que es auténtica con respecto a dicha primera muestra.

En otra forma de realización, el control de vacunación puede tener lugar por adición de un antígeno de vacunación a una célula T específica del antígeno presente en la sangre completa de una quinta muestra que es auténtica con respecto a dicha primera muestra.

En aún otra forma de realización del proceso de acuerdo con la invención, el inhibidor de la secreción se selecciona del grupo que consiste de brefeldina A, monensina o semejantes.

De acuerdo con la invención, la determinación del perfil de citoquinas se efectúa por medio de métodos adecuados, tal como citometría de flujo.

El proceso de acuerdo con la invención se puede aplicar a muestras de sangre completa de seres humanos o animales.

El proceso de acuerdo con la invención se aplica particularmente para efectuar un seguimiento del contacto en

donde la sangre completa se obtuvo de una persona en estrecho contacto con un paciente con TB activa o sospechada de tener un contacto estrecho con un paciente con TB activa.

Aún más, dependiendo del resultado del ensayo de diagnóstico de la invención, se establece una decisión de tratamiento o régimen de la siguiente manera:

a. una profilaxis, tal como INH, o un tratamiento activo, tal como una terapia cuádruple, está indicada en los casos donde se detectó un cambio en el perfil de citoquinas para células IFN- $\gamma$  simples positivas acompañado de una disminución de células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles;

b1. si las investigaciones de diagnóstico revelaron una infección latente con *Mycobacterium tuberculosis* por células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles y no se dispone de información acerca de pruebas anteriores, no es necesaria una terapia aguda y el paciente debe volver a ser evaluado dentro de las 2 a 4 semanas;

b2. si las investigaciones de diagnóstico revelaron una infección latente por *Mycobacterium tuberculosis* por las células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles y si pruebas anteriores para una infección latente por *Mycobacterium tuberculosis* no revelaron ningún contacto con *Mycobacterium tuberculosis*, estará indicada una profilaxis, tal como una terapia INH;

c1. no está indicada ninguna terapia aguda si el paciente no presenta ninguna respuesta.

c2. en el caso que el paciente revele algún síntoma clínico, se recomienda una nueva evaluación.

El proceso de acuerdo con la invención se puede emplear además para investigar sangre completa que se obtuvo de una persona antes que recibiera drogas inmunosupresoras o con una infección por VIH de tipo estado inmunoincompetente.

Dependiendo del resultado del ensayo de diagnóstico de la invención, se establece una decisión de tratamiento o régimen de la siguiente manera:

a. una profilaxis, tal como INH, o un tratamiento activo, tal como una terapia cuádruple, y opcionalmente un retardo de una terapia inmunosupresora, está indicada en los casos donde se detectó un cambio en el perfil de citoquinas para células IFN- $\gamma$  simples positivas acompañado de una disminución de células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles;

b1. si las investigaciones de diagnóstico revelaron una infección latente con *Mycobacterium tuberculosis* por células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles y no se dispone de información acerca de pruebas anteriores, es posible una terapia inmunosupresora y el paciente debe volver a ser evaluado dentro de entre 2 y 4 semanas;

b2. si las investigaciones de diagnóstico revelaron una infección latente por *Mycobacterium tuberculosis* por las células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles y si pruebas anteriores para una infección latente por *Mycobacterium tuberculosis* no revelaron hasta el momento ningún contacto

con *Mycobacterium tuberculosis*, y estará indicada una profilaxis, tal como una terapia INH y opcionalmente un retardo de una terapia inmunosupresora, así como una nueva evaluación del paciente dentro de 2 a 4 semanas;

c1. se comenzará con una terapia inmunosupresora si el paciente no presenta ninguna respuesta;

c2. en el caso que el paciente revele algún síntoma clínico, se recomienda una nueva evaluación.

El proceso de acuerdo con la invención se puede emplear además para investigar sangre completa que se obtuvo de una persona sospechada de sufrir una infección de TB activa.

Dependiendo del resultado del ensayo de diagnóstico de la invención, se establece una decisión de tratamiento o régimen de la siguiente manera:

a. un tratamiento activo, tal como una terapia cuádruple, está indicada en los casos donde se detectó un cambio en el perfil de citoquinas para células IFN- $\gamma$  positivas simples acompañado de una disminución de células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles;

b1. si las investigaciones de diagnóstico revelaron una infección latente por *Mycobacterium tuberculosis* con células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles y no hay información disponible acerca de pruebas anteriores, es poco probable una infección aguda, se debe considerar un diagnóstico alternativo, y el paciente debe volver a ser evaluado dentro de las 2 a 4 semanas;

si las investigaciones de diagnóstico revelaron una infección latente por *Mycobacterium tuberculosis* con células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles y si pruebas anteriores por una infección latente con *Mycobacterium tuberculosis* no revelaron hasta el momento contacto con *Mycobacterium tuberculosis*, está indicada una profilaxis, tal como INH o un tratamiento activo, tal como una terapia cuádruple, y el paciente debe volver a ser evaluado dentro de las 2 a 4 semanas;

c1. no está indicada ninguna terapia aguda si el paciente no presenta ninguna respuesta;

c2. en el caso que el paciente revele algún síntoma clínico, se recomienda una nueva evaluación.

La Figura 1 muestra el ciclo de infección de *M. tuberculosis*.

La Figura 2 muestra análisis por citometría de flujo de las células T específicas de antígenos, que fueron identificadas meramente por el análisis de la citoquina IFN- $\gamma$ . Se encontró que no es posible distinguir una tuberculosis activa (A-TB) y una tuberculosis tratada con éxito (T-TB) mediante tan solo un análisis de IFN- $\gamma$  independientemente de la estimulación con PPD, ESAT-6 o CFP-10. ESAT-6 y CFP-10 solamente permiten discriminar entre pacientes que habían tenido contacto con *M. tuberculosis* (positivos para ESAT-6 y/o CFP-10) y pacientes con una respuesta de vacunación BCG pura (negativos para ESAT-6 y CFP-10, no se muestra).

En la Figura 3 se muestra la distribución de frecuencia de células T específicas de PPD en pacientes con tuberculosis activa (A-TB) y en sujetos con tuberculosis tratada con éxito (T-TB). Las células T fueron identificadas por activación con CD69 y la inducción específica de IFN- $\gamma$  por PPD. Se observa que aunque los pacientes con A-TB tienen frecuencias significativamente más altas de células T específicas de PPD, no es posible distinguir entre una tuberculosis activa (A-TB) y una tuberculosis tratada con éxito (T-TB) mediante el simple análisis de IFN- $\gamma$  en el caso individual debido a la gran superposición.

En la Figura 4 se muestra a modo de ejemplo los perfiles de citoquinas IFN- $\gamma$ /IL-2 de células T reactivas con PPD en cuatro pacientes con tuberculosis tratada con éxito. Los porcentajes de células T IFN- $\gamma$  positivas simples, IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles e IL-2 positivas simples se cuantifica en el lado izquierdo de la Figura. La proporción predominante de las células expresa ambas citoquinas.

En la Figura 5 se muestra a modo de ejemplo los perfiles de citoquinas IFN- $\gamma$ /IL-2 de células T reactivas con PPD en cuatro pacientes con tuberculosis activa. Los porcentajes de células T IFN- $\gamma$  positivas simples, IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles e IL-2 positivas simples se cuantifica en el lado derecho de la Figura. Los pacientes con una tuberculosis presentan un cambio en el perfil de citoquinas para células IFN- $\gamma$  positivas simples acompañado por una

disminución de células T IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles.

En la Figura 6 se muestra una representación resumida de los perfiles de citoquinas en pacientes con tuberculosis activa (A-TB) y con tuberculosis tratada con éxito (T-TB). La línea de guiones representa el límite de células T IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles (56%) debajo del cual se puede diagnosticar una tuberculosis activa con una especificidad del 100% y una sensibilidad del 70%. Este límite se estableció por medio de un análisis de características operativas del receptor (ROC).

La invención se explicará además por medio de los siguientes Ejemplos.

Ventajosamente, la producción de INF- $\gamma$  por la célula específica del antígeno se determina intracelularmente en el proceso de acuerdo con la invención. Por consiguiente, se puede acortar el tiempo de estimulación de las células T específicas de antígenos con los antígenos de tuberculosis PPD (derivado de proteínas purificado), ESAT-6 (blanco antigénico de secreción temprana) y CFP-10 (proteínas de filtrado de cultivo) a 6 horas contra las 20 horas de las pruebas anteriores (Figura 2). Aunque la determinación de células T reactivas para PPD que expresan INF- $\gamma$  ya tiene lugar a una frecuencia estadísticamente significativa mayor en pacientes con tuberculosis activa en comparación con pacientes con una tuberculosis latente o tratada con éxito, no es posible distinguir las dos etapas de la enfermedad para el paciente individual debido a un rango de

superposición muy grande (Figura 3). Los antígenos ESAT-6 y CFP-10 meramente permiten discriminar entre pacientes que han tenido contacto con *M. tuberculosis* (positivos para ESAT-6 o CFP-10) y pacientes con una respuesta de vacunación de BCG pura (negativos para ESAT-6 y CFP-10, no se muestra). Sin embargo, la distinción entre una tuberculosis activa y latente o tratada con éxito es posible por la activación con CD69 en células T específicas de PPD y por la determinación simultánea de IFN- $\gamma$  y de interleuquina-2 (IL-2). Si bien la fracción predominante de las células T reactivas para PPD expresan ambos INF- $\gamma$  e IL-2 en la tuberculosis latente o tratada con éxito (Figura 4), el perfil de citoquinas cambiará hacia células IFN- $\gamma$  positivas simples en una tuberculosis activa (Figura 5). Un análisis de las características operativas del receptor (ROC) permite establecer el límite de células T IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles reactivas para PPD por debajo del cual se puede diagnosticar una tuberculosis activa con una especificidad del 100%. En la población de la presente, este límite es de 56% de células T IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles, y los pacientes con una tuberculosis activa (A-TB) se pueden distinguir así de los pacientes con una tuberculosis tratada con éxito (T-TB) con una sensibilidad del 70% (Figura 6).

En otra forma de realización, la determinación del perfil de citoquinas se efectúa por medio de citometría de flujo con anticuerpos marcados. Por consiguiente, además de

la determinación de INF- $\gamma$ , también es posible la cuantificación simultánea de otras moléculas de la superficie funcionalmente relevantes, tales como PD-1 (muerte programada-1), CTLA-4 (antígeno de linfocitos T citotóxico 4), TIM-3 (dominio de inmunoglobulina y dominio de mucina 3 de células T), u otras citoquinas, tales como interleuquina-2, TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ) o IP-10 (ligando 10 (motivo C-X-C) de quimioquinas).

Para el análisis de células T CD4 específicas de antígenos por citometría de flujo, se excitan células T específicas por estimulación con antígenos antes de la activación y producción de citoquinas, y luego se detecta la cantidad de células excitadas por medio de anticuerpos específicos. Para el examen de las células T específicas de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), se emplean los antígenos PPD, ESAT-6 y CFP-10. Para distinguir la tuberculosis activa de la tuberculosis latente/tratada con éxito, se conduce una prueba con PPD, y para diferenciar una tuberculosis latente/tratada con éxito infección de una vacunación previa, se conduce una prueba con ESAT-6 y CFP-10. PBS sirve como control negativo, con el cual se pueden establecer las señales basales, tal como células T de respuesta no específica. SEB sirve como un control positivo.

La estimulación se puede efectuar directamente con la sangre completa. Primero, se mezcla la sangre completa con anticuerpos específicos de CD28 y CD49d a una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  cada uno y luego se mezclan con los respectivos

antígenos (PPD: 7,32 µg/ml, tuberculina RT-50; *Statens Serum Institute*, Copenhagen, Dinamarca); las estimulaciones se efectuaron con agrupaciones de péptidos derivados de *Mtb* que comprenden ESAT-6 y CFP-10. Las agrupaciones de péptidos CFP-10 y ESAT-6 están compuestas por 15-mers de superposición de 11 aminoácidos, y todos los péptidos se purificaron por HPLC [>80% de pureza, Hariri et al., *Nature Medicine* 2011; **17**: 372-376].

Después de 2 horas de tiempo de incubación (37 °C, 6% de CO<sub>2</sub>), se detuvo la exocitosis de las citoquinas inducida por la estimulación por adición de brefeldina A (BFA) 10 µg/ml con el fin de acumular las citoquinas intracelularmente. Esto es seguido por otras 4 horas de incubación (37 °C, 6% de CO<sub>2</sub>).

La estimulación se interrumpe después de 6 horas y se fijan las células. Primero, se agrega EDTA 2 mM a cada muestra, seguido por mezclado durante 10 segundos e incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos. La fijación de los glóbulos blancos y la lisis de los eritrocitos se realizan con 9 ml de solución de lisado de Becton Dickinson por mililitro de sangre completa para un tiempo de incubación de 10 minutos a temperatura ambiente. Después de una centrifugación y succión del sobrenadante, el pélet de células obtenido se lava con 2 ml de solución amortiguadora FACS (PBS-5 FCS-0,5% de BSA-0,07% de NaN<sub>3</sub>). Esto se efectúa por adición de la solución amortiguadora FACS, seguido por centrifugación y succión del

sobrenadante. Finalmente, las células fijadas se toman en solución amortiguadora FACS. Ahora las células se pueden teñir directamente o guardar en el refrigerador a 4 °C durante la noche. Para teñir las células estimuladas con anticuerpos marcados con fluoró cromos específicos, las células se redistribuyen en tubos FACS. Se usan los leucocitos de aproximadamente 225-300 µl de sangre completa por mezcla de tinción. Primero, se agregan 2 ml de solución amortiguadora de saponina (solución amortiguadora FACS/0,1% de saponina) por muestra sobre un período de 10 min. Después de una centrifugación y succión de la solución amortiguadora SAP, se efectúa la adición de la mezcla de anticuerpos en un volumen total de 50 µl de cada uno por muestra de solución amortiguadora FACS/0,1% de saponina (anti-clon SK3 CD4, anti-clon 4S.B3 IFN- $\gamma$ , anti-clon MQ1-17H12 IL-2 y anti-clon L78 CD69). Dado que los anticuerpos son sensibles a la luz, los 30 min de incubación tienen lugar en oscuridad a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavan con 3 ml de solución amortiguadora FACS para eliminar los anticuerpos no unidos. Finalmente, el pélet celular se toma en 150 µl de solución de paraformaldehído al 1% y se analiza por medio de citometría de flujo.

En la tuberculosis tratada con éxito, se encontró que una fracción predominante de células T específicas de antígenos expresan ambos IFN- $\gamma$  e IL-2 luego de una estimulación específica con PPD. Sorprendentemente, cuando

existe una tuberculosis activa, el perfil de citoquinas cambiará hacia células IFN- $\gamma$  positivas simples acompañado por una disminución de células T IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles. Una infección por tuberculosis latente o tratada con éxito puede distinguirse de una respuesta de vacunación por estimulación con ESAT-6 y CFP-10. Los antígenos ESAT-6 y CFP-10 permiten discriminar entre pacientes que han estado en contacto con *M. tuberculosis* (positivos para ESAT-6 y/o CFP-10) y pacientes con una respuesta de vacunación de BCG pura (negativos para ESAT-6 y CFP-10).

**REIVINDICACIONES:**

1. Un proceso in-vitro para la determinación rápida del estado de infección de una infección por *Mycobacterium tuberculosis* a partir de sangre completa en términos de una tuberculosis activa o latente, que comprende los pasos de:

- estimular una célula T específica del antígeno presente en una primera muestra de sangre completa con derivado de proteínas purificado (PPD) en la presencia de anticuerpos contra CD28 o CD28 y CD49d;
- procesar el PPD por células presentadoras de antígenos (APC) por incubación durante 1,5 h a 2,5 h, en especial durante 2 h, a 35 °C - 39 °C, en especial a 37 °C, opcionalmente con adición de CO<sub>2</sub>;
- luego agregar un inhibidor de la secreción;
- realizar un mezclado exhaustivo; y
- incubar adicionalmente por un período de al menos 2,5 h a una temperatura de entre 35 °C y 39 °C, y
- determinar el perfil de citoquinas a partir de la producción de INF- $\gamma$  intracelular y la producción de IL-2 intracelular de la célula T específica del antígeno; en donde
- la presencia de una tuberculosis activa está indicada por un cambio en el perfil de citoquinas para células IFN- $\gamma$  simples positivas acompañado por una disminución de células T IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1,

en donde se efectúa otra estimulación con SEB, ESAT-6 y CFP-10 y/o antígeno de vacunación además de dicha estimulación con PPD.

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde se obtiene un control negativo por adición de una solución amortiguadora fisiológica tal como PBS 0,9% de NaCl o 5% de glucosa a una célula T específica del antígeno presente en la sangre completa de una segunda muestra, que es auténtica con respecto a dicha primera muestra.

4. El proceso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se obtiene un control positivo por adición de SEB a una célula T específica del antígeno presente en la sangre completa de una tercera muestra, que es auténtica con respecto a dicha primera muestra.

5. El proceso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 4 en donde se condujo un control de vacunación por adición del antígeno de vacunación a una célula T específica del antígeno presente en la sangre completa de una cuarta muestra que es auténtica con respecto a dicha primera muestra.

6. El proceso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde se conduce un control de vacunación de BCG por adición de ESAT-6 (blanco antigénico de secreción temprana) y de CFP-10 (proteínas de filtrado de cultivo) a una célula T específica del antígeno presente en la sangre completa de una cuarta muestra, que es

auténtica con respecto a dicha primera muestra.

7. El proceso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde un control ya sea si estuvo o no en contacto con micobacterias que no son de tuberculosis en la sangre completa donante se condujo por adición de ESAT-6 (blanco antigénico de secreción temprana) y de CFP-10 (proteínas de filtrado de cultivo) a una célula T específica del antígeno presente en la sangre completa de una quinta muestra, que es auténtica con respecto a dicha primera muestra.

8. El proceso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho inhibidor de la secreción se selecciona del grupo que consiste de brefeldina A, monensina o semejantes.

9. El proceso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la determinación del perfil de citoquinas se efectúa por citometría de flujo.

10. El proceso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la sangre completa de las muestras deriva de seres humanos o animales.

11. El proceso de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 10, aplicado para efectuar un seguimiento del contacto en donde la sangre completa se obtuvo de una persona en estrecho contacto con un paciente con TB activa o sospechada de tener un contacto estrecho con un paciente con TB activa.

12 El proceso de acuerdo con la reivindicación 11,

en donde la decisión de tratamiento se toma de la siguiente manera:

- a. una profilaxis, tal como INH, o una terapia activa, tal como una terapia cuádruple, está indicada en los casos donde se detectó un cambio en el perfil de citoquinas para células IFN- $\gamma$  simples positivas acompañado de una disminución de células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles;
- b1. si las investigaciones de diagnóstico revelaron una infección latente con *Mycobacterium tuberculosis* por células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles y no se dispone de información acerca de pruebas anteriores, no es necesaria una terapia aguda y el paciente debe volver a ser evaluado dentro de las 2 a 4 semanas;
- b2. si las investigaciones de diagnóstico revelaron una infección latente por *Mycobacterium tuberculosis* por las células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles y si pruebas anteriores para una infección latente por *Mycobacterium tuberculosis* no revelaron ningún contacto con *Mycobacterium tuberculosis*, estará indicada una profilaxis, tal como una terapia INH;
- c1. no está indicada ninguna terapia aguda si el paciente no presenta ninguna respuesta.
- c2. en el caso que el paciente revele algún síntoma clínico, se recomienda una nueva evaluación.

13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 a 10, en donde la sangre completa se obtuvo de una persona antes que recibiera drogas inmunosupresoras o con una

infección por VIH de tipo estado inmunoincompetente.

14. El proceso de la reivindicación 13, en donde la decisión de tratamiento se toma de la siguiente manera:

- a. una profilaxis, tal como INH, o un tratamiento activo, tal como una terapia cuádruple, y opcionalmente un retardo de una terapia inmunosupresora, está indicada en los casos donde se detectó un cambio en el perfil de citoquinas para células IFN- $\gamma$  simples positivas acompañado de una disminución de células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles;
- b1. si las investigaciones de diagnóstico revelaron una infección latente con *Mycobacterium tuberculosis* por células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles y no se dispone de información acerca de pruebas anteriores, es posible una terapia inmunosupresora y el paciente debe volver a ser evaluado dentro de entre 2 y 4 semanas;
- b2. si las investigaciones de diagnóstico revelaron una infección latente por *Mycobacterium tuberculosis* por las células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles y si pruebas anteriores para una infección latente por *Mycobacterium tuberculosis* no revelaron hasta el momento ningún contacto con *Mycobacterium tuberculosis*, y estará indicada una profilaxis, tal como una terapia INH y opcionalmente un retardo de una terapia inmunosupresora, así como una nueva evaluación del paciente dentro de 2 a 4 semanas;
- c1. se comenzará con una terapia inmunosupresora si el

paciente no presenta ninguna respuesta;

c2. en el caso que el paciente revele algún síntoma clínico, se recomienda una nueva evaluación.

15. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 a 10, en donde la sangre completa se obtuvo de una persona sospechada de sufrir una infección activa por TB.

16. El proceso de la reivindicación 15, en donde la decisión de tratamiento se toma de la siguiente manera:

a. un tratamiento activo, tal como una terapia cuádruple, está indicada en los casos donde se detectó un cambio en el perfil de citoquinas para células IFN- $\gamma$  positivas simples acompañado de una disminución de células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles;

b1. si las investigaciones de diagnóstico revelaron una infección latente por *Mycobacterium tuberculosis* con células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles y no hay información disponible acerca de pruebas anteriores, es poco probable una infección aguda, se debe considerar un diagnóstico alternativo, y el paciente debe volver a ser evaluado dentro de las 2 a 4 semanas;

b2. si las investigaciones de diagnóstico revelaron una infección latente por *Mycobacterium tuberculosis* con células IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles y si pruebas anteriores por una infección latente con *Mycobacterium tuberculosis* no revelaron hasta el momento contacto con *Mycobacterium tuberculosis*, está indicada una profilaxis, tal como INH o un tratamiento activo, tal

como una terapia cuádruple, y el paciente debe volver a ser evaluado dentro de las 2 a 4 semanas;

- c1. no está indicada ninguna terapia aguda si el paciente no presenta ninguna respuesta;
- c2. en el caso que el paciente revele algún síntoma clínico, se recomienda una nueva evaluación.

**PROCESO IN VITRO PARA LA DETERMINACIÓN RÁPIDA EN UN PACIENTE DEL ESTADO DE INFECCIÓN CON *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

RESUMEN

Un proceso in-vitro para la determinación rápida del estado de infección de una infección por *Mycobacterium tuberculosis* a partir de sangre completa en términos de una tuberculosis activa o latente, que comprende los pasos de:

- estimular una célula T específica del antígeno presente en una primera muestra de sangre completa con derivado de proteínas purificado (PPD) en la presencia de anticuerpos contra CD28 o CD28 y CD49d;
- procesar el PPD por células presentadoras de antígenos (APC) por incubación durante 1,5 h a 2,5 h, en especial durante 2 h, a 35°C - 39°C, en especial a 37°C, opcionalmente con adición de CO<sub>2</sub>;
- luego agregar un inhibidor de la secreción;
- realizar un mezclado exhaustivo; y
- incubar adicionalmente por un período de al menos 2,5 h a una temperatura de entre 35 °C y 39 °C, y
- determinar el perfil de citoquinas a partir de la producción de INF- $\gamma$  intracelular y la producción de IL-2 intracelular de la célula T específica del antígeno; en donde
- la presencia de una tuberculosis activa está indicada por un cambio en el perfil de citoquinas para células IFN- $\gamma$  simples positivas acompañado por una disminución de células T IFN- $\gamma$ /IL-2 positivas dobles.

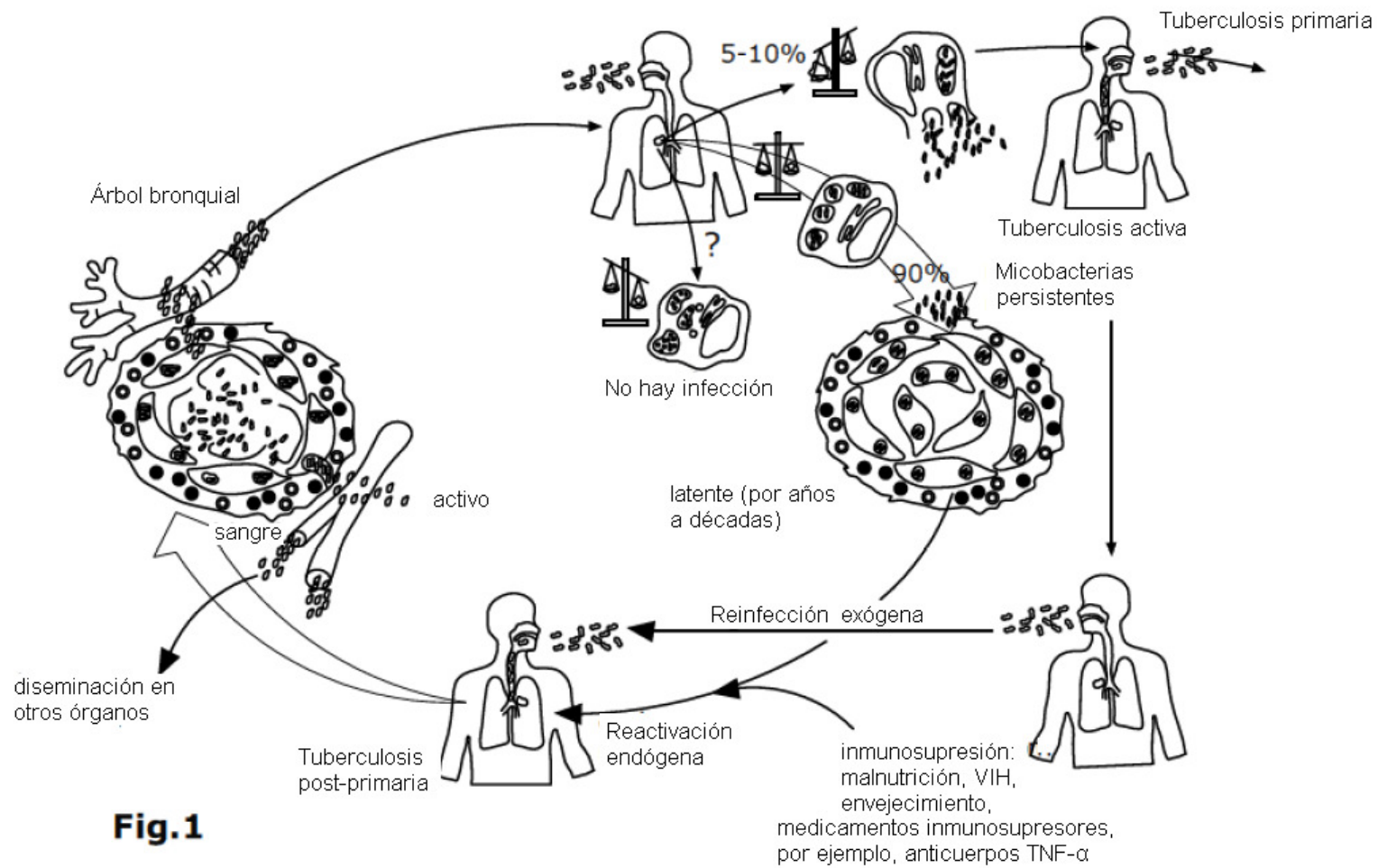


Fig. 2

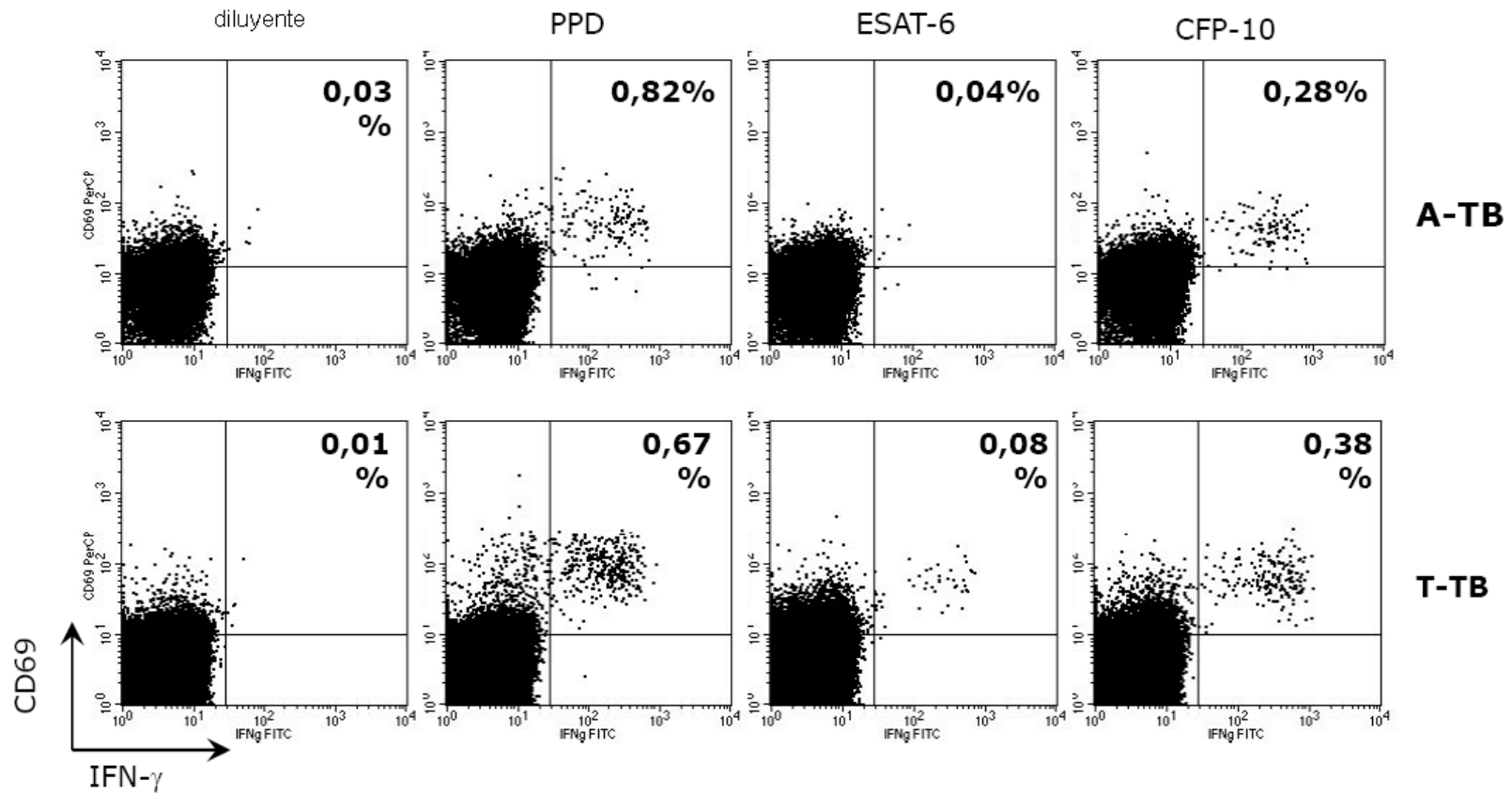


Fig. 3

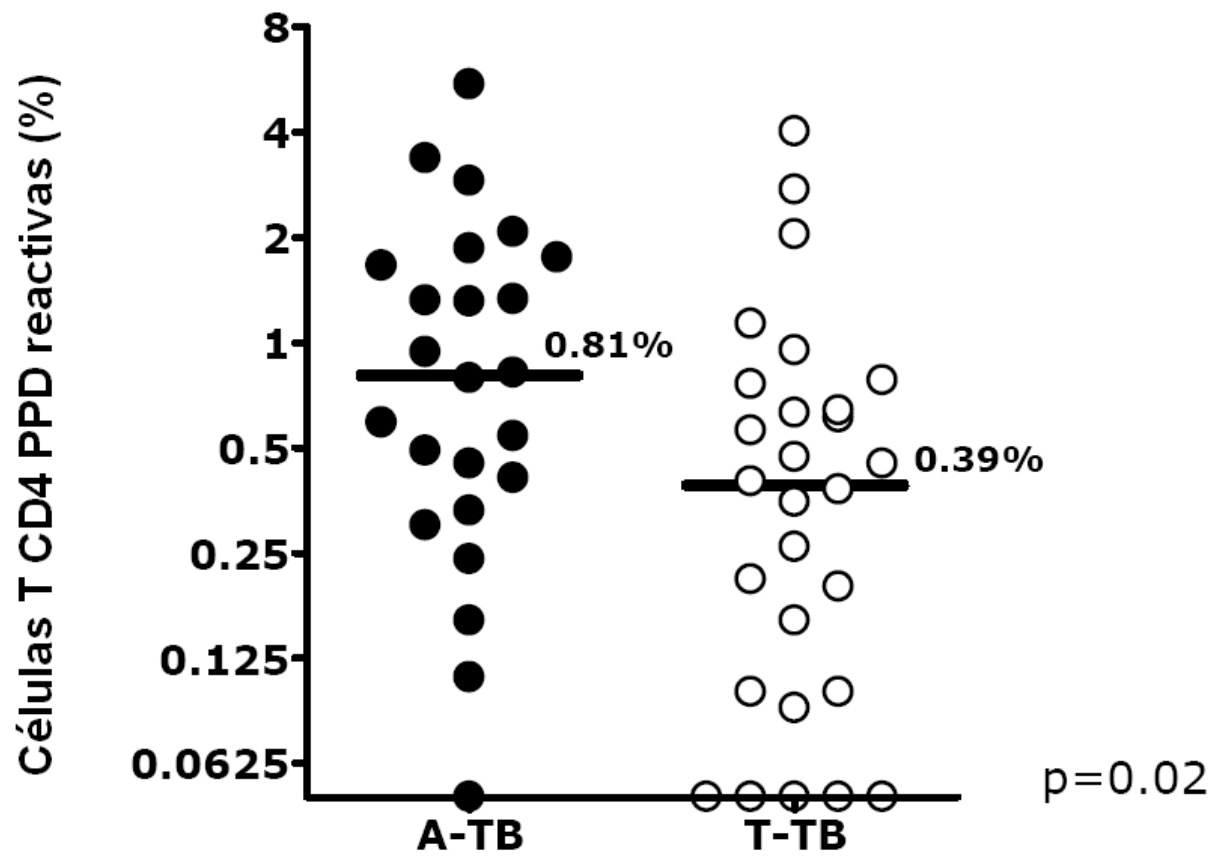


Fig. 4

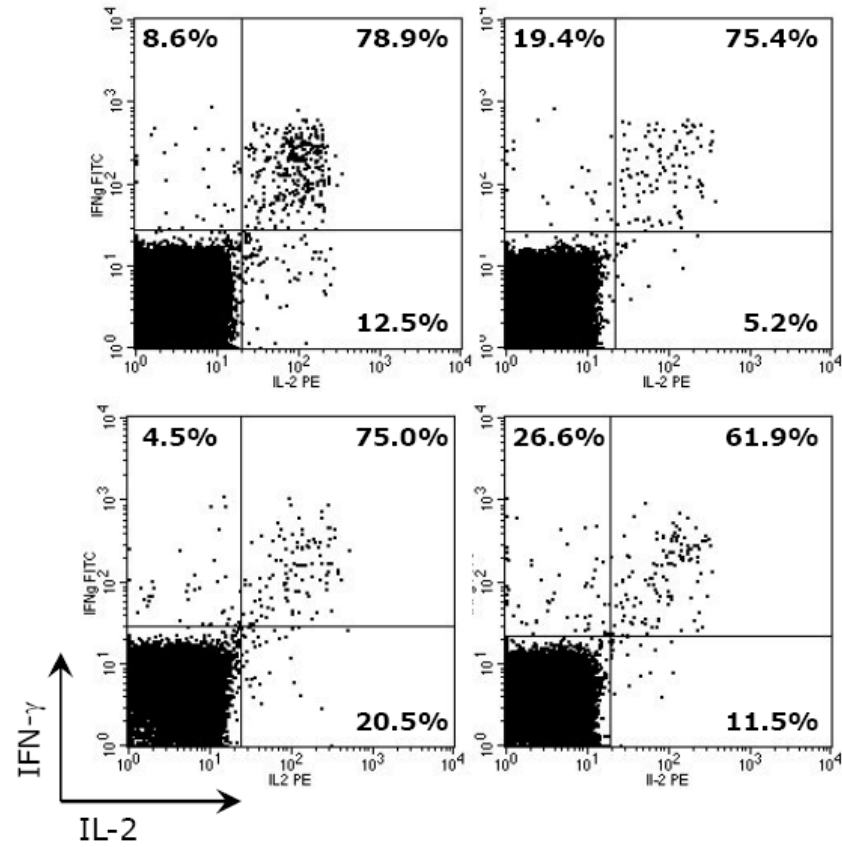
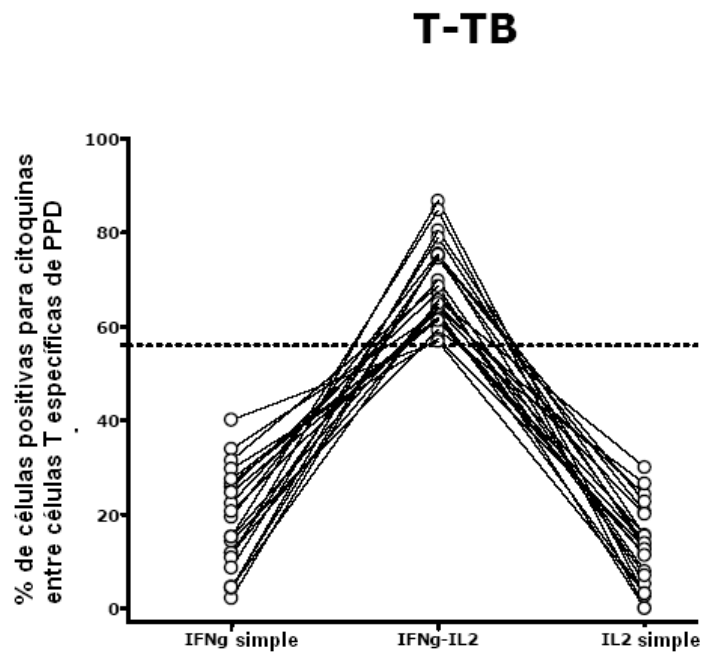


Fig. 5

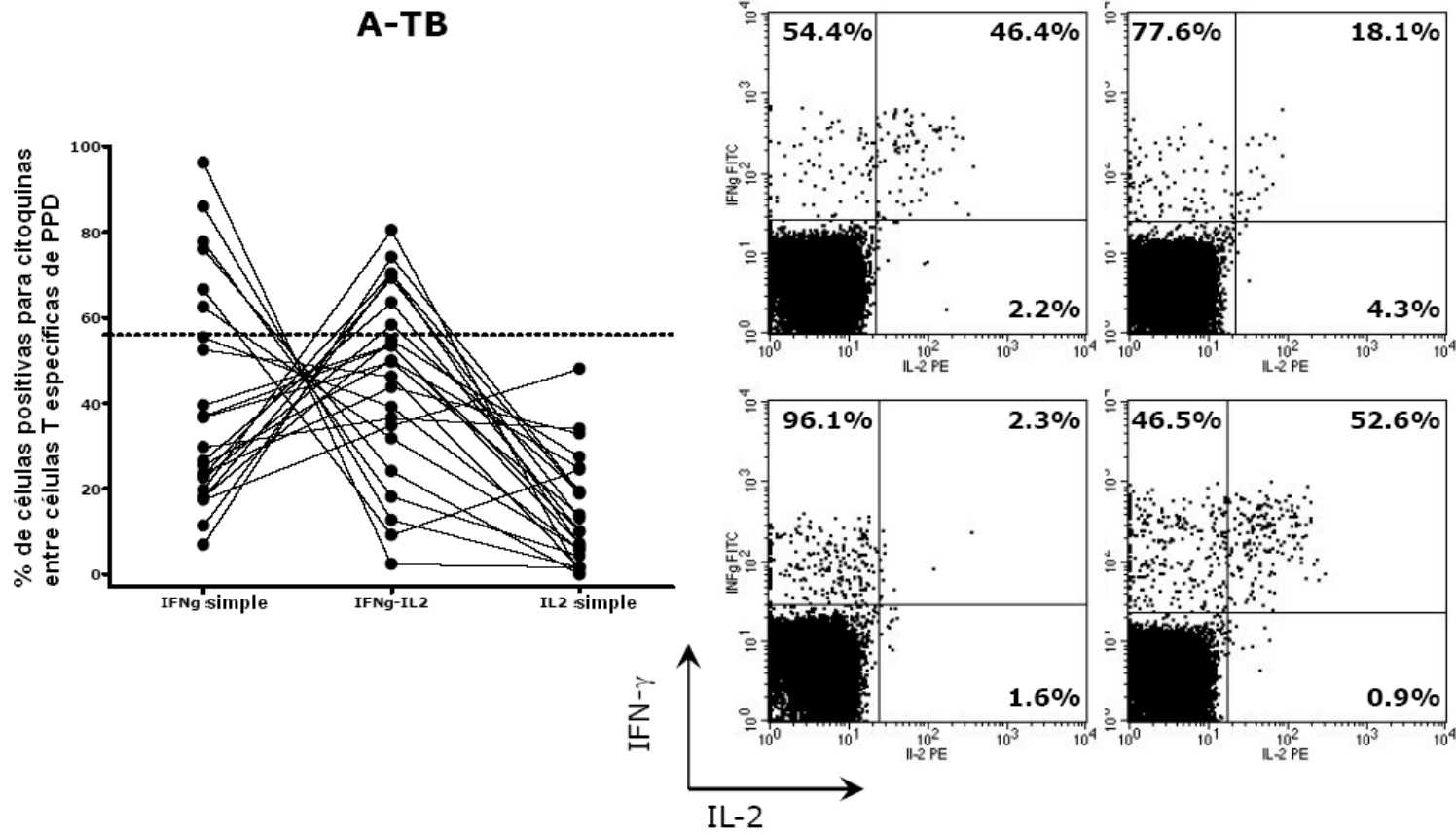
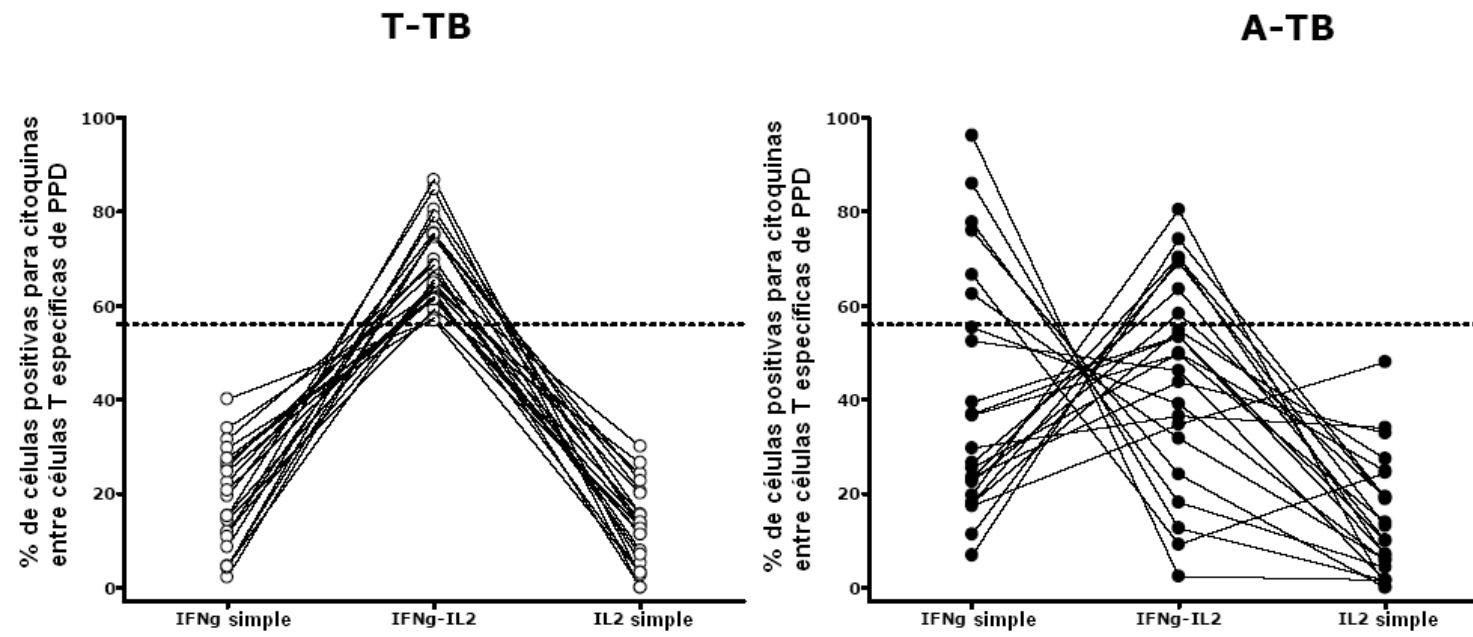


Fig. 6



# PATENT COOPERATION TREATY

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

# PCT

## WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing  
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference  
see form PCT/ISA/220

**FOR FURTHER ACTION**  
See paragraph 2 below

International application No.  
PCT/EP2011/054207

International filing date (day/month/year)  
21.03.2011

Priority date (day/month/year)  
19.03.2010

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC  
INV. G01N33/50 G01N33/569

Applicant  
RED FLAG DIAGNOSTICS GMBH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

### 2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office  
D-80298 Munich  
Tel. +49 89 2399 - 0  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of  
this opinion

see form  
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Hinchliffe, Philippe

Telephone No. +49 89 2399-8431



---

**Box No. I Basis of the opinion**

---

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
  - ☒ the international application in the language in which it was filed
  - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
  - a. (means)
    - ☐ on paper
    - ☐ in electronic form
  - b. (time)
    - ☐ in the international application as filed
    - ☐ together with the international application in electronic form
    - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

---

**Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

---

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 11-16

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 11-16

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13~~ter~~.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details

---

**Box No. IV Lack of unity of invention**

---

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
  - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
  - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
  - ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
  - ☒ not complied with for the following reasons:  
**see separate sheet**
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts.
  - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-10

---

**Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

---

1. Statement
- |                               |             |             |
|-------------------------------|-------------|-------------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims |             |
|                               | No: Claims  | <u>1-10</u> |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims |             |
|                               | No: Claims  | <u>1-10</u> |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | <u>1-10</u> |
|                               | No: Claims  |             |
2. Citations and explanations
- see separate sheet**

Reference is made to the following documents:

- D1        SARGENTINI VALERIA ET AL: "Cytometric detection of antigen-specific IFN-gamma/IL-2 secreting cells in the diagnosis of tuberculosis.", BMC INFECTIOUS DISEASES 2009 LNKD- PUBMED:19549330, vol. 9, 2009, page 99, ISSN: 1471-2334
- D2        MILLINGTON KERRY A ET AL: "Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 178, no. 8, 15 April 2007 (2007-04-15), pages 5217-5226, XP002448599, ISSN: 0022-1767
- D3        SESTER URBAN ET AL: "Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active States.", Database accession no. NLM21423578 ; & PLOS ONE 2011 LNKD- PUBMED:21423578, vol. 6, no. 3, 2011, page e17813, ISSN: 1932-6203
- D4        BAL A M ET AL: "Dysregulation of proinflammatory and regulatory cytokines in HIV infected persons with active tuberculosis", CYTOKINE, ACADEMIC PRESS LTD, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 30, no. 5, 7 June 2005 (2005-06-07), pages 275-281, XP004909381, ISSN: 1043-4666, DOI: DOI:10.1016/J.CYTO.2005.01.015

1.1    The claims cover, what appears to be a correction of an erroneous or incorrectly positioned step, namely the determination of the cytokine profile (step 2) prior to processing of PPD (step 3) found in (parent) double application EP10157086. The claims appear to cover a standard flow cytometry intracellular cytokine staining assay (ICS) carried out on blood taken from a possible TB patient in order to assess the stage of disease as active.

1.2 In addition several new claims have appeared which cover testing a fifth blood sample (cl. 7), contact tracing (cls. 11,12), source of blood being an immunocompromised patient (cls. 13,14) and source of blood being a patient suspected of having a TB infection (cls. 15,16). None of these claims subject matter is found in the priority document and thus these claims are NOT entitled to the priority date. In addition a therapeutical indication is provided in several different cases of results (parts (a)-(c2) of claims 12,14,16) only one of which is supported by the priority document (part a).

2. An *ex posteriori* lack of unity of invention objection (Article 17(3)(a) PCT) has been made (see search report) because further therapeutic indications based upon interpretation of data based upon a known method are claimed. The underlying inventive concept covered by these subsequent claims is varied and may be split into parts (see also point 1.2 above).

#### INVENTION 1

3. The closest prior art appears to be D1 (Sargentini). The abstract of this document notes that the problem to be solved is to offer a more accurate diagnosis of the different stages of TB (see "Background"). In this respect the aim appears to be identical to that of claims 1-16. The methods used are a flow cytometry analysis of PPD stimulated T cells to see whether they are producing either or both IL-2 and IFN-gamma (see methods). This document notes that IL-2 may be used to stage the disease wherein an increase in IL-2 production occurs in latent infection rather than active infection. Active infection is correlated with high IFN-gamma production (see results). It is considered therefore that this document makes the same observation as the current step (a) insofar as an increase in IL-2 production in latency is equivalent to reduction in active phase. The data supporting this occurs in fig.1 and is further covered in the discussion. Here it is concluded that single IFN-gamma producing cells are sufficient to detect active TB sufferers from controls. Further this document concludes that a decrease in single IFN-gamma producing cells and an increase in double producing IL-2 and IFN-gamma cells is shown in latently infected patients. In other words the same findings as currently covered by claim 1-10 are already noted in D 1. Consequently this document is considered to be novelty destroying for claims 1-10 (Article 33(2) PCT).

4. D2 also compares the change in two cytokine profiles in active and treated TB. Again it notes that in active TB a predominance of IFN-gamma producing cells exists that shifts to codominance with IL-2/IFN-gamma production in latent infection. Whilst a different method was used to measure the levels of the various cytokines in the t cells, the results are the same as those currently claimed (i.e. that active TB is indicated by IFN-gamma producing T cells outweighing IL-2/IFN-gamma producing cells). In combination with D1 this document may be considered to be inventive step destroying for the subject matter of claims 1-10 because the flow cytometry method is an alternative to that used in D2 (Article 33(3) PCT).

# TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES

Del ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

PCT

A

*Ver formulario PCT/ISA/220*INFORME ESCRITO  
DEL ORGANISMO DE  
BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(regla PCT N° 43bis.1)

Fecha de envío (día/mes/año)

*Ver formulario PCT/ISA/210 (hoja 2)*

Referencia del Solicitante o Agente

*Ver formulario PCT/ISA/220*

PROCEDER

*Ver abajo, punto 2*

Referencia Internacional

*PCT/EP 2011/054207*Fecha de Presentación Internacional  
(día/mes/año)*21.03.2011*

Fecha de Prioridad(día/mes/año)

*19.03.2010*

Clasificación Internacional de Patentes (IPK) o clasificación nacional e IPC

*INV. G01N 33/50 G01N 33/569*

Solicitante

*RED FLAG DIAGNOSTICS GMBH*

1. Este informe contiene indicaciones acerca de los siguientes puntos:

- ☒ Campo N° I Fundamento del informe
- ☐ Campo N° II Prioridad
- ☒ Campo N° III No realización de dictamen alguno sobre novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial
- ☒ Campo N° IV Carencia de unidad de la invención
- ☒ Campo N° V Resolución fundada según regla PCT 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y declaraciones destinados a apoyar esta resolución.
- ☐ Campo N° VI Documentos específicos expuestos
- ☐ Campo N° VII Falencias específicas de la solicitud internacional
- ☐ Campo N° VIII Observaciones específicas a la solicitud internacional

2. **PROCEDER**

Cuando se solicita un Examen Preliminar Internacional, este informe es válido como informe escrito del organismo encargado de la búsqueda internacional ("IPEA"); esto no es así cuando, según la regla 66.1bis(b), el solicitante elige otro organismo distinto a este como IPEA y el IPEA elegido informó a la Oficina Internacional que los informes escritos de este organismo de búsqueda internacional no serán considerados.

Cuando este informe es válido como informe escrito de IPEA, tal como está previsto arriba, el solicitante es intimado a presentar ante IPEA una posición por escrito, y cuando corresponde, modificaciones, en el plazo de 3 meses a partir de la fecha en la que fue remitido el formulario PCT/ISA/220 o en el plazo de 22 meses a partir de la fecha de prioridad, según el plazo que venza más tarde.

Para otras opciones, ver formulario PCT/ISA/220.

Nombre y dirección postal del ISA  
Oficina de Patentes Europea  
D\*80298 Múnich  
Tel.: +49 89 2399 - 0  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fecha de confección de  
este informe  
  
*ver formulario  
PCT/ISA/210*

Funcionario autorizado

*Hinchcliffe, Philippe*Teléfono N°: *+49 89 2399 - 8431*

**INFORME ESCRITO DEL  
ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional

*PCT/EP 2011/054207*

**Campo N° I**

**Fundamento del Informe**

1. Con respecto al **idioma**, el informe se basa sobre
  - ☒ La solicitud internacional en el idioma en que fue presentada
  - ☐ una traducción del idioma original al siguiente idioma , el que se trata del idioma de la traducción presentada a los efectos de la búsqueda internacional (según las reglas 12.3 y 23.1 b)).
2. ☐ Este informe ha sido confeccionado teniendo en cuenta la **rectificación de un error obvio** autorizada por o notificada a este Organismo bajo la regla 91 (regla 43*bis*.1(a)).
3. Con respecto a la **secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos** revelada en la solicitud internacional, el informe fue confeccionado sobre la siguiente base:
  - a. (medios)
    - ☐ en papel
    - ☐ en forma electrónica
  - b. (momento)
    - ☐ comprendido en la presentación internacional tal como fue presentada
    - ☐ presentado, junto con la solicitud internacional, en forma electrónica
    - ☐ suministrado posteriormente ante este organismo a los efectos de la búsqueda
4. ☐ Habiendo presentado más de una versión o copia de un protocolo de secuencias y/o la tabla correspondiente se deben presentar adicionalmente las declaraciones requeridas de que la información de las copias presentadas posteriormente o adicionales coinciden con la versión original de la solicitud o que no la supera., lo que corresponda
5. Observaciones adicionales

**INFORME ESCRITO DEL  
ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional N°

*PCT/EP 2011/054207*

**Campo N° III      No confección de un informe con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial**

La cuestión acerca de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucra actividad inventiva (no obvia) o es aplicable industrialmente no fue examinada con respecto a:

☐ toda la solicitud internacional

☒ reivindicaciones N° 11 - 16

Porque

☐ las mencionadas solicitud internacional completa o reivindicaciones N° ... se refieren al siguiente objeto, el que no requiere un examen preliminar internacional (*especificar*):

☐ la descripción, reivindicaciones o ilustraciones (*indicar elementos particulares abajo*) o las mencionadas reivindicaciones N° son tan poco claras que no se puede confeccionar un informe coherente (*especificar*):

☐ las reivindicaciones o las mencionadas reivindicaciones N° está apoyadas tan inadecuadamente por la descripción que no se puede confeccionar un informe coherente.

☒ no se confeccionó ningún informe de búsqueda internacional para la solicitud completa o para las mencionadas reivindicaciones N° 11 - 16

☐ No se pudo establecer una opinión coherente sin el listado de secuencias; el solicitante, dentro del plazo prescrito:

☐ No suministró un listado de secuencias en papel que cumpla con el estándar provisto para ello en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y tal listado no estaba disponible para el Organismo de Búsqueda Internacional en una forma o manera aceptable para él.

☐ No suministró un listado de secuencias en forma electrónica que cumpla con el estándar provisto para ello en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y tal listado no estaba disponible para el Organismo de Búsqueda Internacional en una forma o manera aceptable para él.

☐ No pagó la tasa requerida por el suministro tardío de un listado de secuencias en respuesta a una intimación según la Regla 13ter.1 (a) o (b).

☐ para mayores detalles, ver campo suplementario.

**INFORME ESCRITO DEL  
ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional N°  
*PCT/EP 2011/054207*

| Campo N° IV                   | Carencia de unidad de la invención                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |            |  |  |             |                   |           |  |                                 |           |                          |                   |           |  |                                 |           |                               |                   |           |  |                                 |           |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|--|--|-------------|-------------------|-----------|--|---------------------------------|-----------|--------------------------|-------------------|-----------|--|---------------------------------|-----------|-------------------------------|-------------------|-----------|--|---------------------------------|-----------|
| 1.                            | <input checked="" type="checkbox"/> En respuesta a la intimación (formulario PCT/ISA/206) de pagar tasas adicionales, el solicitante, dentro de los plazos establecidos: <div style="margin-left: 40px;"> <input type="checkbox"/> ha pagado las tasas adicionales<br/> <input type="checkbox"/> ha pagado las tasas adicionales bajo protesta y, si corresponde, la tasa de protesta<br/> <input type="checkbox"/> ha pagado las tasas adicionales bajo protesta pero no la correspondiente tasa de protesta<br/> <input checked="" type="checkbox"/> no ha pagado las tasas adicionales           </div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |            |  |  |             |                   |           |  |                                 |           |                          |                   |           |  |                                 |           |                               |                   |           |  |                                 |           |
| 2.                            | <input type="checkbox"/> Este Organismo considera que no se cumple el requisito de unidad de invención y opta por no intimar al solicitante a pagar las tasas adicionales                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |            |  |  |             |                   |           |  |                                 |           |                          |                   |           |  |                                 |           |                               |                   |           |  |                                 |           |
| 3.                            | <input type="checkbox"/> Este Organismo considera que el requisito de unidad de invención acorde con las reglas 13.1, 13.2 y 13.3 <div style="margin-left: 40px;"> <input type="checkbox"/> se cumple<br/> <input checked="" type="checkbox"/> no se cumple por las siguientes razones:<br/><br/> <i>Ver campo suplementario</i> </div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |            |  |  |             |                   |           |  |                                 |           |                          |                   |           |  |                                 |           |                               |                   |           |  |                                 |           |
| 4.                            | En consecuencia, este informe ha sido confeccionado con respecto a las siguientes partes de la solicitud internacional: <div style="margin-left: 40px;"> <input type="checkbox"/> todas las partes<br/> <input checked="" type="checkbox"/> las partes relacionadas con las reivindicaciones N° <u>1 – 10</u> </div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |            |  |  |             |                   |           |  |                                 |           |                          |                   |           |  |                                 |           |                               |                   |           |  |                                 |           |
| Campo N° V                    | Resolución fundada según regla PCT 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y declaraciones destinadas a apoyar esta resolución                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |            |  |  |             |                   |           |  |                                 |           |                          |                   |           |  |                                 |           |                               |                   |           |  |                                 |           |
| 1.                            | <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%; vertical-align: top;">Resolución</td> <td style="width: 40%;"></td> <td style="width: 20%;"></td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 40px;">Novedad (N)</td> <td>Reivindicaciones:</td> <td style="text-align: right;"><i>SÍ</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Reivindicaciones: <u>1 – 10</u></td> <td style="text-align: right;"><i>NO</i></td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 40px;">Actividad inventiva (IS)</td> <td>Reivindicaciones:</td> <td style="text-align: right;"><i>SÍ</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Reivindicaciones: <u>1 – 10</u></td> <td style="text-align: right;"><i>NO</i></td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 40px;">Aplicabilidad industrial (AI)</td> <td>Reivindicaciones:</td> <td style="text-align: right;"><i>SÍ</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Reivindicaciones: <u>1 – 10</u></td> <td style="text-align: right;"><i>NO</i></td> </tr> </table> | Resolución |  |  | Novedad (N) | Reivindicaciones: | <i>SÍ</i> |  | Reivindicaciones: <u>1 – 10</u> | <i>NO</i> | Actividad inventiva (IS) | Reivindicaciones: | <i>SÍ</i> |  | Reivindicaciones: <u>1 – 10</u> | <i>NO</i> | Aplicabilidad industrial (AI) | Reivindicaciones: | <i>SÍ</i> |  | Reivindicaciones: <u>1 – 10</u> | <i>NO</i> |
| Resolución                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |            |  |  |             |                   |           |  |                                 |           |                          |                   |           |  |                                 |           |                               |                   |           |  |                                 |           |
| Novedad (N)                   | Reivindicaciones:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <i>SÍ</i>  |  |  |             |                   |           |  |                                 |           |                          |                   |           |  |                                 |           |                               |                   |           |  |                                 |           |
|                               | Reivindicaciones: <u>1 – 10</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <i>NO</i>  |  |  |             |                   |           |  |                                 |           |                          |                   |           |  |                                 |           |                               |                   |           |  |                                 |           |
| Actividad inventiva (IS)      | Reivindicaciones:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <i>SÍ</i>  |  |  |             |                   |           |  |                                 |           |                          |                   |           |  |                                 |           |                               |                   |           |  |                                 |           |
|                               | Reivindicaciones: <u>1 – 10</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <i>NO</i>  |  |  |             |                   |           |  |                                 |           |                          |                   |           |  |                                 |           |                               |                   |           |  |                                 |           |
| Aplicabilidad industrial (AI) | Reivindicaciones:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <i>SÍ</i>  |  |  |             |                   |           |  |                                 |           |                          |                   |           |  |                                 |           |                               |                   |           |  |                                 |           |
|                               | Reivindicaciones: <u>1 – 10</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <i>NO</i>  |  |  |             |                   |           |  |                                 |           |                          |                   |           |  |                                 |           |                               |                   |           |  |                                 |           |
| 2.                            | Documentos y declaraciones:<br><br><u><b>Ver hoja adjunta</b></u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |            |  |  |             |                   |           |  |                                 |           |                          |                   |           |  |                                 |           |                               |                   |           |  |                                 |           |

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1      *SARGENTINI VALERIA ET AL: "Cytomeric detection of antigen-specific IFN-gamma/IL-2 secreting cells in the diagnosis of tuberculosis.", BMC INFECTIOUS DISEASES, 2009 LNKD- PUB:MED: 19549330, vol. 9, 2009, pp. 99, ISSN: 1471-2334*
- D2      *MILLINGTON KERRY A ET AL.: Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGIST, US, vol. 178, N° 8, 15 de abril de 2007 (2007-04-15), páginas 5217 – 5226, XP002448599, ISSN: 0022-1767*
- D3      *SESTER URBAN ET AL: "Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CDA T-cell Cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active States", Database accession N° NLM21423578; & PLOS ONE 2011 LNKD-PUBMED: 21423578, vol. 6, N° 3, E17813, ISSN: 1932-6203*
- D4      *BAL A M ET AL: "Dysregulation of proinflamtory and regulatory cytokines in HIV infected persons with active tuberculosis", CYTOKINE, ACADEMIC PRESS LTD, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 30, N° 5, 7 de junio de 2005 (2005-06-07), páginas 275-281, XP004909381, ISSN: 1043-4666, DOI: DOI: 10.1016 /J.Cyto02005.01.015*

- 1.1 Las reivindicaciones abarcan lo que parece ser una corrección de un paso erróneo o incorrectamente posicionado, a saber: la determinación del perfil de la citoquina (paso 2) antes del procesamiento de PPD (paso 3), encontrado duplicado en la solicitud EP 10157086 (de la familia). Las reivindicaciones parecen abarcar una citometría intracelular de flujo estándar mediante tinción de citoquina (ICS) llevado a cabo en sangre tomada de un posible paciente TB, a los fines de evaluar el grado de enfermedad como activo.
- 1.2 Adicionalmente aparecieron varias nuevas reivindicaciones que abarcan el ensayo de una quinta muestra de sangre (reiv. 7), seguimiento del contacto (reivs.11-12), la fuente de la sangre siendo un paciente inmunocomprometido (reivs. 13, 14), la fuente de la sangre es un paciente sospechado de tener una infección de TB (reivs. 15, 16). Ninguno de estos objetos reivindicados es encontrado en el documento de prioridad y por ello estas reivindicaciones NO tienen derecho a la fecha de prioridad. Está prevista adicionalmente una indicación terapéutica en varios casos de resultados (partes (a)-(c2) de las reivindicaciones12, 14, 16), uno solo de los cuales está sustentado en el documento de prioridad (parte a).
2. Se efectuó una objeción de carencia de unidad *ex posteriori* a la invención (Artículo PCT 17(3)(a)) (ver informe de búsqueda), porque se reivindican otras indicaciones terapéuticas basadas sobre una interpretación de datos sustentada en métodos conocidos. El concepto inventivo subyacente cubierto por estas reivindicaciones posteriores es variado y puede ser separado en partes (ver también punto 1.2, arriba).

**INVENCION 1**

3. El estado de la técnica más cercano parece ser D1 (Sargentini). El resumen de este documento hace notar que el problema a ser resuelto es ofrecer un diagnóstico más exacto de las diferentes etapas de la TB (ver "fundamentos"). A este respecto, el objetivo parece ser idéntico al de las reivindicaciones 1-16. Los métodos utilizados son un análisis citométrico de flujo de células estimuladas con PPD para ver si se producen uno o los dos IL-2 e IFN-gamma (ver métodos). Este documento hace ver que IL-2 puede ser utilizado para graduar la enfermedad, dado que un incremento de producción de IL-2 procede más en una infección latente que en una infección activa. Una infección activa se correlaciona con una elevada producción de IFN-gama (ver resultados). Por lo tanto, se considera que este documento hace la misma observación que el presente paso (a), en la medida en que un incremento de la producción latente de IL-2 es equivalente a una reducción en la fase activa. Los datos que sustentan esto se exhiben en la figura 1 y son luego cubiertos en la discusión. Allí se concluye que células individuales que producen IFN-gamma son suficientes para detectar enfermos TB activos mediante el control. Además, este documento concluye que, en pacientes infectados en forma latente se presenta una disminución de células individuales productoras de IFN-gamma y un incremento en la producción de ambas células IL-2 e IFN-gamma. En otras palabras, los mismos descubrimientos que los cubiertos por las presentes reivindicaciones 1-10 ya han sido observados en D1. En consecuencia, se considera que este documento destruye la novedad para las reivindicaciones 1-10 (Artículo PCT 33(2)).
4. D2 también compara el cambio en dos perfiles de citoquina en TB activa y tratada. Nuevamente se observa que en la TB activa existe un predominio de producción de células IFN-gamma que se desplaza a un condominio con la producción de IL-2/IFN-gamma en la infección latente. En tanto se utilizó un método distinto para medir los niveles de varias citoquinas en las células T, los resultados son los mismos que los reivindicados presentes (por ejemplo, el TB activo está indicado por células T productoras de IFN-gamma que contrarrestan la producción de células IL-2/IFN-gamma). Se considera que este documento, en combinación con D1, destruye la actividad inventiva del objeto de las reivindicaciones 1-10 porque el método de citometría de flujo es alternativo al utilizado en D2 (Artículo PCT 33(3)).

Posibles pasos luego de recibir el informe de búsqueda internacional (ISR) y el informe escrito del Organismo de Búsqueda Internacional (WO-ISA).

|                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Información general                                        | Para todas las solicitudes internacionales presentadas el o después del 01/01/2004, el ISA competente establecerá un ISR. El mismo será acompañado por el WO-ISA. A diferencia del anterior informe escrito del IPEA (Regla PCT 66.2), el WO-ISA no debe ser contestado, pero debe ser tomado en consideración para posteriores pasos del procedimiento. Este documento explica acerca de las posibilidades.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Enmendar reivindicaciones según Art. PCT 19                | Dentro de los dos meses después de la fecha de envío del ISR y el WO-ISA, el solicitante puede presentar reivindicaciones enmendadas según el Art. PCT 19 directamente en la Oficina Internacional del WIPO. La reforma del PCT de 2004 no cambió este procedimiento. Para más información rogamos ver la regla PCT 46, además del formulario PCT/ISA/220 y las correspondientes notas al formulario PCT/ISA/220.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Presentar una demanda para examen preliminar internacional | <p>En principio, el WO-ISA puede ser considerado el informe escrito del IPEA. Esto puede, en muchos casos, hacer innecesario presentar una demanda de examen preliminar internacional. Si el solicitante, a pesar de todo, desea presentar una demanda, esto debe llevarse a cabo antes de antes de la expiración de 3 meses a partir de la fecha de envío al ISR/WO-ISA o de 22 meses a partir de la fecha de prioridad, según la que expire más tarde (Regla PCT 54<i>bis</i>). Las enmiendas según el art. PCT 34 pueden ser presentadas ante el IPEA como lo anterior, normalmente al mismo tiempo que se presenta la demanda (Regla PCT 66.1(b)).</p> <p>Si se presenta una demanda de examen preliminar internacional y no se recibieron enmiendas/comentarios, el WO-ISA será transformado por el IPEA en el IPRP (Informe Preliminar Internacional sobre Patentabilidad), que refleja únicamente el contenido del WO-ISA. La demanda puede ser retirada (Art. PCT 37).</p> |
| Presentar comentarios informales                           | Luego de recibir el WO-ISA, el solicitante puede presentar comentarios acerca del WO-ISA directamente en la Oficina Internacional del WIPO. Estos serán comunicados a las Oficinas designadas junto con el IPRP (Informe Preliminar Internacional sobre Patentabilidad) a los 30 meses a partir de la fecha de prioridad. Rogamos referirse al siguiente campo.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Final de la fase internacional                             | Al final de la fase internacional, la Oficina Internacional del WIPO transformará el WO-ISA o, si se presentó una demanda, el informe escrito del IPEA en el IPRP, el que será transmitido junto con los posibles comentarios informales a las Oficinas designadas. El IPRP reemplazará al anterior IPER (informe de examen preliminar internacional).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Reglas PCT relevantes y más información                    | Regla PCT 43, regla PCT 43 <i>bis</i> , regla PCT 44, regla PCT 44 <i>bis</i> , PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

# PATENT COOPERATION TREATY

# PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                                 |                                                                                                                  |                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br><b>110151WO ME/ris</b> | <b>FOR FURTHER ACTION</b><br><small>see Form PCT/ISA/220<br/>as well as, where applicable, item 5 below.</small> |                                                                         |
| International application No.<br><b>PCT/EP2011/054207</b>       | International filing date ( <i>day/month/year</i> )<br><b>21/03/2011</b>                                         | (Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> )<br><b>19/03/2010</b> |
| Applicant<br><br><b>RED FLAG DIAGNOSTICS GMBH</b>               |                                                                                                                  |                                                                         |

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

**1. Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1
- ☒ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2011/054207

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-10

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2011/054207

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. G01N33/50 G01N33/569  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | SARGENTINI VALERIA ET AL: "Cytometric detection of antigen-specific IFN-gamma/IL-2 secreting cells in the diagnosis of tuberculosis.", BMC INFECTIOUS DISEASES, vol. 9, 99, 2009, pages 1-10, XP002631778, ISSN: 1471-2334<br>the whole document<br>-----<br>-/-- | 1-10                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 April 2011

Date of mailing of the international search report

06/07/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hinchliffe, Philippe

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2011/054207

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                       |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                            | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                        | Relevant to claim No. |
| X                                                    | MILLINGTON KERRY A ET AL: "Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load",<br>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 178, no. 8,<br>15 April 2007 (2007-04-15), pages 5217-5226, XP002448599,<br>ISSN: 0022-1767<br>the whole document<br>----- | 1-10                  |
| T                                                    | SESTER URBAN ET AL: "Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active States.",<br>PLOS ONE,<br>vol. 6, no. 3, E17813, 2011, pages 1-7, XP002631779,<br>ISSN: 1932-6203<br>abstract<br>-----                                                                       | 1-10                  |

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-10

A method for the determination of TB infection status in an individual based upon pre-stimulation of a blood sample followed by flow cytometry wherein active TB is diagnosed by a particular profile.

---

2. claims: 11, 12

The process of claim 1 used for contact tracing and therapy.

---

3. claims: 13, 14

The process of claim 1 using immunosuppressed persons samples and therapy.

---

4. claims: 15, 16

The process of claim 1 wherein the blood sample comes from a person suspected of having an active TB infection and therapy.

---

**TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL  
EN MATERIA DE PATENTES**

**PCT**

**Informe de Búsqueda Internacional**

(Artículo PCT 18, así como reglas PCT 43 y 44)

|                                                                   |                                                                                                           |                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Referencia del solicitante o del agente<br><b>110151WO ME/ris</b> | <b>PROCEDER</b> Ver notificación formulario PCT/ISA/220, así como, en tanto corresponda, el punto 5.abajo |                                                                           |
| Solicitud Internacional N°:<br><b>PCT/EP 2011/054207</b>          | Fecha de presentación Internacional<br>(día/mes/año)<br><b>21/03/2011</b>                                 | Fecha de prioridad (la más antigua)<br>(día/mes/año)<br><b>19/03/2011</b> |
| Solicitante<br><b>RED FLAG DIAGNOSTICS GMBH</b>                   |                                                                                                           |                                                                           |

Este Informe de Búsqueda Internacional fue elaborado por el Organismo de Búsqueda Internacional y, de acuerdo con el artículo 18, es enviado al solicitante. Se envía una copia a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda Internacional comprende, en total, 5 hojas.

☐ Además se adjunta una copia de cada uno de los documentos del estado de la técnica mencionados en este informe

**1. Fundamentos del Informe**

a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional fue llevada a cabo sobre la base de:

- ☒ la solicitud internacional en el idioma en que fue presentada  
☐ una traducción de la solicitud internacional al \_\_\_\_\_, que es el idioma de una traducción suministrada a los fines de la búsqueda internacional (reglas 12.3(a) y 23.1 (b)).

b. ☐ Este informe de búsqueda internacional ha sido confeccionado teniendo en consideración la **rectificación de un error obvio**, autorizada por o notificada a este organismo según la regla 91 (regla 43.6bis(b))

c. ☐ Con respecto a los **nucleótidos y/o aminoácidos** revelados en la solicitud internacional, ver campo N° 1

2. ☐ **Determinadas reivindicaciones no eran investigables** (ver campo II).

3. ☒ **La invención carece de unidad** (ver campo III).

4. Con respecto al **título**,

- ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.  
☐ el texto fue establecido por el organismo como sigue:

5. Con respecto al **resumen**,

- ☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.  
☐ el texto fue establecido por el organismo, de acuerdo con la regla 38.2 b), en la versión indicada en el campo IV. El solicitante puede presentar una posición ante el organismo durante el transcurso de un mes a partir de la fecha de envío de este Informe de Búsqueda Internacional.

6. Con respecto a las **ilustraciones**

a. Con el resumen se debe publicar la siguiente figura de Las **ilustraciones**: figura N° -1-.

- ☒ sugerida por el solicitante.  
☐ seleccionada por el organismo, dado que el mismo solicitante no sugiere ninguna figura.  
☐ seleccionada por el organismo, dado que esta figura caracteriza mejor la invención.

b. ☐ con el resumen no se publica ninguna de las ilustraciones

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Referencia Internacional

PCT/EP 2011/054207

### **Campo II: Observaciones acerca de porque determinadas reivindicaciones no eran investigables (continuación del ítem 2 de la hoja 1)**

Este Informe de Búsqueda Internacional no fue realizado con respecto a algunas reivindicaciones, según el artículo 17(2)(a), por las siguientes razones:

1. ☐ Reivindicaciones N°:  
porque se refieren a objetos que no requieren ser investigados por este Organismo, a saber:
2. ☐ Reivindicaciones N°:  
porque se refieren a partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requisitos prescritos en una extensión que no permite llevar a cabo una búsqueda internacional, específicamente:
3. ☐ Reivindicaciones N°:  
porque son reivindicaciones dependientes y no están desarrolladas en acordanza con la segunda y la tercera frase de la regla 6.4(a).

### **Campo III: Observaciones por falta de uniformidad de la invención (continuación del ítem 3 de la hoja 1)**

Este Organismo de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, a saber:

*ver hoja adicional*

1. ☐ Como todas las tasas adicionales requeridas fueron abonadas en término por el solicitante, este Informe de Búsqueda Internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Como todas las reivindicaciones investigables pueden ser investigadas sin un esfuerzo que justifique una tasa adicional, este Organismo no solicita ningún pago o tasa adicional.
3. ☐ Como solo algunas de las tasas adicionales fueron abonadas en término por el solicitante, este Informe de Búsqueda Internacional cubre solo aquellas reivindicaciones para los cuales fueron abonadas las tasas, específicamente, las reivindicaciones N°:
4. ☒ Ninguna de las tasas adicionales requeridas fue abonada en término por el solicitante. En consecuencia, este Informe de Búsqueda Internacional está restringido a la invención mencionada inicialmente en las reivindicaciones; estando la misma cubierta por las reivindicaciones N°:

*1 – 10*

#### **Observaciones sobre protestas**

- ☐ Las tasas de búsqueda adicionales fueron acompañadas por la protesta del solicitante y, cuando correspondía, el pago de la tasa de protesta
- ☐ Las tasas de búsqueda adicionales fueron acompañadas por la protesta del solicitante pero la tasa de protesta solicitada no fue pagada en el plazo especificado en la intimación
- ☐ El pago de las tasas de búsqueda adicionales no fue acompañado por ninguna protesta.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°:

PCT/EP 2011/054207

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <p>A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD</p> <p>INV. G01N 33/50 G01N 33/569</p> <p>ADD.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                               |
| <p>Según la clasificación internacional de patentes (IPC) o las clasificaciones nacional e IPC</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                               |
| <p>B. ÁMBITOS INVESTIGADOS</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                               |
| <p>Documentación mínima investigada (Sistema de clasificación y símbolos de clasificación)</p> <p>G01N</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                               |
| <p>Publicaciones investigadas pero no pertenecientes al material mínimo investigado, en tanto pertenezcan al ámbito investigado</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                               |
| <p>Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y expresiones de búsqueda eventualmente empleadas)</p> <p>EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                               |
| <p>C. ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                               |
| <p>Categoría</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <p>Denominación de la publicación, así como, de ser apropiado, indicación de los pasajes relevantes</p>                                                                                                                                                                                     | <p>Relevante para reivindicación N°:</p>                                      |
| <p>X</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <p>SARGENTINI VALERIA ET AL: "Cytomeric detection of antigen-specific IFN-gamma/IL-2 secreting cells in the diagnosis of tuberculosis.",<br/>BMC INFECTIOUS DISEASES<br/>vol. 9, 99, 2009, pp. 1-10, XP002631778<br/>ISSN: 1471-2334<br/>todo el documento</p> <p>-----<br/>-----//----</p> | <p>1-10</p>                                                                   |
| <p><input checked="" type="checkbox"/> Otras publicaciones están listadas en la continuación del campo C</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                               |
| <p><input checked="" type="checkbox"/> Ver familia de patentes en el anexo</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                               |
| <p>* Categorías particulares indicadas en publicaciones</p> <p>"A" publicación que define el estado general de la técnica pero no considerada como particularmente importante</p> <p>"B" documento anterior pero publicado recién o después de la de la fecha de presentación internacional</p> <p>"L" publicación adecuada para hacer aparecer como dudosa una reivindicación de prioridad, o mediante la cual debe ser considerada la fecha de divulgación de otra publicación mencionada en el informe de búsqueda o que es indicada por otra razón particular (como realizada)</p> <p>"O" publicación que se refiere a una revelación oral, a una utilización, a una exposición o a otras disposiciones</p> <p>"P" publicación realizada antes de la fecha de presentación internacional pero luego de la fecha de prioridad reivindicada</p>          |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                               |
| <p>"T" publicaciones posteriores a las difundidas en la fecha de presentación internacional o de la fecha de prioridad y que no colisionan con la solicitud, sino que solo están indicadas para mayor entendimiento del principio fundamental de la invención o de la teoría sobre la cual se basa</p> <p>"X" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada, solo como consecuencia de esta publicación, como novedosa o apoyarse en una actividad inventiva</p> <p>"Y" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada como apoyada en una actividad inventiva cuando puede ser relacionada con una o varias otras publicaciones de esta categoría y tal relación es notoria para un especialista</p> <p>"&amp;" publicación que es miembro de la misma familia</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                               |
| <p>Fecha de finalización de la búsqueda internacional</p> <p>7 de abril de 2011</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <p>Fecha de envío del Informe de Búsqueda Internacional</p> <p>06/07/2011</p> |
| <p>Nombre y Dirección Postal del ISA/<br/>Oficina de Patentes Europea<br/>NL – 2280 HV Rijswijk<br/>Tel (+31-70) 340-2040.<br/>Fax N° (+31-70) 340-3016</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <p>Funcionario Apoderado</p> <p>Hinchlife, Philippe</p>                       |

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional N°:

PCT/EP 2011/054207

| <b>C. (continuación) ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                         |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Categoría</b>                                              | <b>Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <b>Referente a la reivindicación N°</b> |
| X                                                             | <p>MILLINGTON KERRY A ET AL.: <i>Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load</i>"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGIST, US,</p> <p>Vol. 178, N° 8,</p> <p>15 de abril de 2007 (2007-04-15),</p> <p>páginas 5217 – 5226, XP002448599</p> <p>ISSN: 0022-1767</p> <p>Todo el documento</p> <p>-----</p> | 1-10                                    |
| T                                                             | <p>SESTER URBAN ET AL: <i>"Whole-blood flow-cytrometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell Cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active States"</i></p> <p>PLOS ONE</p> <p>Vol. 6, N° 3, E17813, 2011, páginas 1-7,</p> <p>XP002631779</p> <p>ISSN: 1932-6203</p> <p>resumen</p> <p>-----</p>                                                                                      | 1-10                                    |

**MÁS INFORMACIÓN CONTINUADA DE PCT/ISA/ 210**

Este Organismo de Búsqueda Internacional encontró múltiples (grupos de) invenciones en esta solicitud internacional, a saber:

1. reivindicaciones: 1-10

Un método para la determinación de un estado infeccioso de TB en un individuo, basado sobre una pre-estimulación de una muestra de sangre seguida por una citometría de flujo, en el cual se diagnostica TB activa mediante un perfil particular

---

2. reivindicaciones: 11, 12

El procedimiento de la reivindicación 1 utilizado para contactar el seguimiento y la terapia.

---

3. reivindicaciones: 13, 14

El procedimiento de la reivindicación 1 utilizando muestras y terapias de personas unmunodeprimidas .

---

4. reivindicaciones: 15, 16

El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual la muestra de sangre proviene de una persona sospechada de tener una infección activa de TB y terapia.

---