



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 214**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05755429 .7**
96 Fecha de presentación : **09.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1756582**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Marcadores para aterosclerosis.**

30 Prioridad: **09.06.2004 GB 0412859**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.06.2011

73 Titular/es: **IMMUNOCLIN Ltd.**
Rowlandson House, 289-293 Ballards Lane
London N12 8NP, GB

72 Inventor/es: **Bray, Dorothy;**
Clerici, Mario y
Trabattoni, Daria, Lucia

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 361 214 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Marcadores para aterosclerosis.

5 Esta invención se refiere a marcadores para aterosclerosis. Más particularmente la presente invención se refiere a la identificación de varios marcadores encontrados en la sangre y a su uso para ayudar al diagnóstico o pronóstico de, o para identificar una predisposición hacia la aterosclerosis y especialmente la susceptibilidad al desarrollo de placas ateroscleróticas y/o obstrucción vascular.

10 La aterosclerosis es una remodelación patológica de las arterias que es una causa principal de morbilidad y mortalidad en países desarrollados; esta patología es la base subyacente del infarto miocárdial, accidente cerebrovascular y enfermedad arterial periférica. La aterosclerosis se puede considerar como una forma inusual de inflamación crónica que ocurre en la pared de la arteria. Varios datos apoyan el papel patogénico o patógeno de la inflamación en la etiología de aterosclerosis; la inflamación es un fenómeno inmunológico. Una de las pruebas de evidencia más convincentes de esta declaración proviene de la observación de que la estría grasa, las lesiones detectables más temprano
15 en la aterosclerosis, contienen células espumosas derivadas de macrófagos que se derivan de monocitos circulatorios. Linfocitos T están también presentes en las placas ateroscleróticas y la mayor parte de estos son células T CD3+CD4+ alfa beta. Tales células representan aproximadamente 2/3 de todas las células T CD3+ en lesiones humanas avanzadas, y segregan IFN gamma, IL-2, TNF alfa y beta que causan la activación vascular de macrófagos, activación
20 vascular e inflamación. IFN gamma se considera ser responsable de la desestabilización de placa reduciendo el tapón fibroso. Células T CD8+ están también presentes en lesiones pero su papel contribuidor en aterosclerosis es menos evidente.

25 El enrollamiento, adhesión, e infiltración de células inmunológicas (monocitos y linfocitos T CD4) que circulan en la sangre periférica en el endotelio se regula por dos familias más importantes de proteínas expresadas en la superficie de células inmunológicas, y en la superficie de células endoteliales: estas familias de proteínas son selectinas e integrinas. Quimiocinas o citoquinas quimioatrayentes son extremadamente importantes también en el control del tráfico de células y para el reclutamiento de células inmunológicas en sitios de inflamación. Algunas quimiocinas, aquellas que pueden funcionar como mediadores potentes de migración de monocitos y diferenciación de macrófagos, se expresan en lesiones ateroscleróticas humanas. En particular, se considera firmemente que la proteína 1
30 quimioatrayente de macrófagos (MCP-1) y su receptor específico CCR2 intervienen en los estadios iniciales de la aterogénesis.

35 Un soporte adicional para el papel patogénico o patógeno de la inflamación en el desarrollo de placas ateroscleróticas proviene de la observación hecha por los presentes inventores de que las citoquinas diferentes preferentemente desencadenan el desarrollo de placas ateroscleróticas (por ejemplo, citoquinas tipo TH1 son "malas citoquinas" dentro de este escenario biológico, es decir, desencadenan o se implican en la activación del desarrollo de placas ateroscleróticas). Esto se vuelve más claro cuando se considera que las citoquinas TH1 son citoquinas inflamatorias prototípicas. Las citoquinas y otras proteínas inmunológicas presentes en las lesiones ateroscleróticas no son sólo producidas por
40 linfocitos T CD4; de hecho, factores de crecimiento de fibroblasto (FGFs) y factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) son factores de crecimiento derivados de macrófagos que se ha descubierto que tienen efectos significativos en la patología de aterosclerosis y que son proteínas derivadas por macrófagos. Mientras sigue aumentando el conocimiento científico de la composición de la placa aterosclerótica y la aportación de células encontradas en lesiones, un diagnóstico fácil y fiable de aterosclerosis, particularmente en ausencia de síntomas clínicos sigue siendo
45 un desafío como la medición y detección de cambios en poblaciones celulares en el sitio de lesión no es viable en la práctica clínica. Consecuentemente hay una necesidad de marcadores predictivos y fáciles de valorar que podrían ser detectados en muestras de sangre periféricas.

50 Los presentes inventores han encontrado que la inmunopatología de placas ateroscleróticas y alteraciones de los factores anteriormente descritos, y sus receptores específicos, suponen cambios de características de poblaciones celulares múltiples que se pueden medir en muestras de sangre y en biopsias vasculares de sangre periférica. Las medidas usadas pueden ser: (porcentajes) de concentraciones de células, expresión de marcadores de superficie celular, concentraciones intracelulares de citoquinas, quimiocinas o integrinas, los cuales solos o junto con otros parámetros son útiles para ayudar al diagnóstico o pronóstico de, o para identificar una predisposición hacia aterosclerosis y especialmente
55 la susceptibilidad al desarrollo de placas ateroscleróticas y/o obstrucción vascular.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para el diagnóstico, pronóstico o identificación de una predisposición hacia aterosclerosis que elimina o reduce la necesidad de técnicas invasivas tal como la eliminación de una placa para identificación o para la necesidad de usar técnicas invasivas de representación por imágenes
60 ópticas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para el diagnóstico, pronóstico o identificación de una predisposición hacia aterosclerosis y la susceptibilidad al desarrollo de placas ateroscleróticas y/o obstrucción vascular, el método comprendiendo el análisis de una muestra para determinar la frecuencia de porcentajes de múltiples subpoblaciones de linfocitos T y comparar los datos obtenidos con datos comparativos y/o de control, donde
65 al menos una de dichas sub-poblaciones es una sub-población de linfocitos T CD8+ seleccionados de los (fenotipos) de subpoblaciones de CD8+/CD11L+/CD45RA+, CD8+/CD11L +/CD45RO+. CD8+CD11 a+, CD8+CD62L+ y

ES 2 361 214 T3

CD8+CD38+RO+, o una sub-población de linfocitos T CD4+ seleccionados de los siguientes fenotipos: CD4+CD25+, CD4+DRII+, CD4+CD44+, CD4+CD62L+ y CD4+CD49d+.

Según se utiliza en este caso “múltiple” significa al menos dos.

Preferiblemente, los porcentajes o proporciones de poblaciones de célula específicas son determinados. Convenientemente, la muestra es una muestra de sangre o una biopsia.

En una forma de realización preferida, el método comprende analizar una muestra para determinar la frecuencia de porcentajes de una o más subpoblaciones de linfocitos T específicos y comparar los datos obtenidos contra datos comparativos y/o de control.

Preferiblemente el método comprende determinar la frecuencia de porcentaje de una o más subpoblaciones de linfocitos T seleccionados de los (fenotipos) de subpoblaciones catalogados en los experimentos 1 y 2 descritos aquí.

En particular, el método comprende la determinación de adhesión, activación, y enrollamiento de marcadores expresados en la superficie de linfocitos T CD8+. Como estas células son las células efectoras del brazo celular de inmunidad, y como se sabe que su activación puede tener un impacto negativo en el desarrollo de enfermedad por medio de la destrucción de células diana (p. ej. la destrucción de células hepáticas que se infectan por virus de hepatitis se media por células T CD8 y se une con el empeoramiento de la enfermedad) o por medio de la inducción de una condición inflamatoria crónica, los inventores creen que centrarse en estas células permite una determinación más precisa de la predisposición hacia aterosclerosis y la susceptibilidad al desarrollo de placas ateroscleróticas y/o obstrucción vascular.

Adicionalmente, el método comprende determinar la frecuencia de porcentaje *simultánea* de subpoblaciones múltiples de linfocitos. Esta propuesta proviene del hecho de que la predisposición hacia aterosclerosis y la susceptibilidad al desarrollo de placas ateroscleróticas y/o obstrucción vascular es multi-factorial y por tanto será imposible predecir con precisión tal predisposición con el análisis de un único marcador.

En una forma de realización preferida, el método comprende determinar la frecuencia de porcentaje de múltiples subpoblaciones de linfocitos T donde al menos una de dichas subpoblaciones es una sub-población de linfocitos T CD8+ y al menos otra de dichas subpoblaciones es una sub-población de linfocitos T CD4+. Preferiblemente las subpoblaciones de CD8+ y CD4+ se seleccionan de los fenotipos catalogados más arriba.

Particularmente preferidas, las subpoblaciones de CD8+ son: CD8+/CD11L+/CD45RA+ y CD8+/CD11L+/CD45RO+. Particularmente preferidas, las subpoblaciones de CD4+ son CD4+CD62L+ y CD4+CD49d+. Idealmente, una o más de cada una de las precedentes subpoblaciones de CD8+ y CD4+ son medidas juntas.

Las cuestiones biológicas que conducen a la definición de tal panel se detallan de la siguiente manera:

- CD8/CD11L/CD45RA; células post-ingenuas que expresan CD11 (aka LFA-1alfa) con una densidad de expresión baja, así estas son células que expresan niveles bajos de la adhesina CD11; esta expresión baja las hace adherirse menos al endotelio. La reducción de estas células en aterosclerosis significa que hay menos células en circulación con una baja “capacidad de adhesión” al endotelio. Estas células son similares a células de la memoria central y migran a la periferia como un efecto posible de una “retroalimentación negativa” que resulta de la formación de placas.
- CD8+/CD11L +/CD45RO+; éstas son células T CD8 que se aumentan en inflamación, similar al fenotipo de células de memoria de efector; estas células también tienen una capacidad reducida de adherirse al epitelio y pueden ser un producto de “retroalimentación negativa” como resultado de formación de placas.
- CD4/CD62L; CD62L es una adhesina (aka L selectina) por tanto un marcador de adhesión expresado en CD4 y utilizado por estas células para adherirse a las altas vénulas endoteliales (HERV) y penetran en la pared vascular.
- CD4/CD25 y CD8/DR11;/CD8/DR11; CD25 es el receptor para IL-2 y su expresión se correlaciona con la inflamación. DRII se expresa por CD4 y CD8 tras su activación, por tanto los datos de los inventores confirman el estado inflamatorio asociado a la aterosclerosis.
- CD4/CD44 y CD4/CD49d; (cd44 aka M-CAM; CD49d aka VLA-4alfa); CD44 y CD49d son moléculas de adhesión; en teoría éstas deberían aumentar en aterosclerosis; la reducción podría ser secundaria a una retroalimentación negativa (es decir, una vía en la cual el cuerpo trata de parar el proceso aterogénico).

El valor predictivo del método de la invención se puede aumentar por suplementación del análisis de diferentes subpoblaciones de linfocitos con más pruebas para otros marcadores inmunológicos implicados en el desarrollo de placas ateroscleróticas y obstrucción vascular. El uso de marcadores múltiples facilita la predicción de la progresión de

ES 2 361 214 T3

la enfermedad con mejor valor predictivo y, por lo tanto, proporciona unos mejores resultados para el paciente porque un tratamiento apropiado puede ser iniciado anteriormente. Múltiples correlaciones inmunológicas proporcionan una herramienta potente predictiva porque hay interdependencia entre los marcadores a diferencia de los diagnósticos de rutina donde muy pocos resultados dependen unos de otros.

Por consiguiente, en otra forma de realización, la invención proporciona un método para el diagnóstico, pronóstico o identificación de una predisposición hacia aterosclerosis y la susceptibilidad al desarrollo de placas ateroscleróticas y/o obstrucción vascular como se ha descrito anteriormente, la cual además comprende determinar la concentración de uno o más factores solubles intracelularmente, en plasma o en suero y comparar los datos obtenidos contra datos comparativos y de control. Preferiblemente, dicho factor soluble es seleccionado del grupo que consiste en citoquinas y quimiocinas. De la forma más preferible, las citoquinas son citoquinas de activación.

En otra forma de realización más, la invención proporciona un método para el diagnóstico, pronóstico o identificación de una predisposición hacia aterosclerosis y la susceptibilidad al desarrollo de placas ateroscleróticas y/o obstrucción vascular como se ha descrito anteriormente, el cual además comprende uno o más de los pasos adicionales (a) y (b):

(a) determinar la frecuencia de porcentaje de células que expresan citoquinas de activación, y/o quimiocinas, y/o integrinas, y/o selectinas en la muestra;

(b) determinar la frecuencia de moléculas de la superficie celular responsables de la activación celular y comparar los datos obtenidos contra datos comparativos y de control.

Se prefiere que toda la información anterior se obtenga de la misma muestra de sangre, y además, los datos de la quimiocina y la citoquina se pueden obtener de suero o plasma. Adicionalmente, la información se puede obtener de una muestra de biopsia. No obstante, se prefiere que el método se use con una muestra de sangre para evitar o reducir la necesidad de tomar muestras de biopsia.

Las citoquinas preferidas incluyen interleuquina-1 (α), interleuquina-2, interleuquina-3, interleuquina-4, interleuquina-5, interleuquina-6, interleuquina-7, interleuquina-8, interleuquina-9; interleuquina-10; interleuquina-11; interleuquina-12; interleuquina-13; interleuquina-14; interleuquina-15; interleuquina-16; interleuquina-17, interferon- α , interferon- β , interferon- γ , factores de necrosis tumoral tales como TNF- α y TNF- β , factores de crecimiento de fibroblasto (FGF), factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), factores estimuladores de colonias tales como G-CSF, GM-CSF, M-CSF, y factores de crecimiento transformantes tal como TGF- β . De estos, TNF- α , IL-12, interferon- α , FGF, y PDGF son especialmente preferidos.

Las quimiocinas preferidas incluyen quimiocinas CC y CXC.

El método puede incluir el paso adicional de determinar la concentración de proteína macrófaga quimioatrayente 1 (MCP-1) en una muestra del mismo paciente.

Opcionalmente, el método puede también comprender los pasos matemáticos de determinar los cambios estadísticos en parámetros inmunológicos que pueden incluir proporciones de población de linfocitos; por ejemplo la proporción de linfocitos CD8+/CD11L+/CD45RA+ a linfocitos CD8+/CD11L+/CD45RO+, puesto que estas dos poblaciones son propensas a ser una parte de la vía de maduración de linfocitos y las proporciones pueden por lo tanto ayudar a determinar si el proceso de maduración es alterado.

Formas de realización de la invención serán ahora descritas puramente a modo de ejemplo no limitativo en el que se hace referencia a las figuras de las cuales:

Figura 1 a a f. Describe cambios en subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de individuos infectados de HIV que desarrollaron (pl+) o no desarrollaron (pl-) placas ateroscleróticas (arteria carótida) según fue determinado por evaluaciones por ecografía doppler y en controles saludables.

Figura 2 a a h. Describe cambios en poblaciones de célula T en sangre periférica de individuos HIV negativos que desarrollaron (pl+) o no desarrollaron (pl-) placas ateroscleróticas (arteria carótida) según fue determinado por evaluaciones por ecografía doppler.

Experimento 1: poblaciones de células T fueron evaluadas en sangre periférica de individuos infectados por HIV que desarrollaron (pl+) o no desarrollaron (pl-) placas ateroscleróticas (arteria carótida) según fue determinado por evaluaciones por ecografía doppler. Datos de 10 controles saludables unidos por sexos y edades fueron también obtenidos. Los datos se presentan en tablas I y II y en la figura 1.

ES 2 361 214 T3

TABLA I

Análisis de varias subpoblaciones de linfocitos diferentes por métodos de FACS en sangre periférica de individuos infectados por HIV que desarrollaron (pl+) o no desarrollaron (pl-) placas ateroscleróticas (arteria carótida) según fue determinado por evaluaciones por ecografía doppler en el experimento 1

Fenotipo	Prueba T		Media	
	Pl+ vs pl-		Pl+	Pl-
CD8+CD25+	0,374225892		2,36	5,80
CD4+CD25+	0,072409562		2,91	0,56
CD8+DRII+	0,282417879		19,83	7,11
CD4+DRII+	0,030600648		23,09	1,55
CD4+CD44+	0,00395716		70,60	20,36
CD8+CD44+	0,160297549		72,80	51,30
CD4+CD11a+	0,225448719		51,05	29,99
CD8+CD11a+	0,074474538		87,70	52,83
CD4+CD62L+	0,21745848		35,67	13,27
CD8+CD62L+	0,029642338		41,87	20,42
CD8+CD38+RO+	0,00295714		12,80	2,35
CD8+CD28-RA+	0,245463793		36,17	52,72
CD4+CD3+RO+	0,085958624		69,50	41,58
CD4+CD62L+RA+	0,654853858		20,98	18,12
CD8+CD11altoRA+	0,166981489		13,57	14,80
CD8+CD11bajoRA+	0,344892909		4,93	16,08
CD8+CD11altoRO+	0,044961021		28,00	10,80
CD4+CD49d	0,034261111		39,10	12,98
CD8+CD49d	ND		40,10	47,80

Los pacientes (N=15/grupo) fueron comparables en términos vitro-inmunológicos y han estado experimentando un ARV basado en PI-.

TABLA II

Datos obtenidos en 10 controles saludables unidos por sexos y edades en experimento 1

Fenotipo	Media	Sd	Se
CD8+CD25+	2,14	0,17591935	0,07
CD4+CD25+	0,84	0,22154221	0,09
CD8+DRII+	7,22	4,19724456	1,71
CD4+DRII+	1,77	0,9772532	0,4
CD4+CD44+	42,16	5,68561259	2,32
CD8+CD44+	29,21	3,33288092	1,36
CD4+CD11a+	19,60	5,92143001	2,42
CD8+CD11a+	30,93	3,40377941	1,39
CD4+CD62L+	32,19	5,790345	2,36
CD8+CD62L+	20,67	3,95462357	1,61
CD8+CD38+RO+	3,83	2,68271451	1,09
CD8+CD28-RA+	49,40	8,18005705	3,34
CD4+CD3+RO+	45,53	5,96984486	2,44
CD4+CD62L+RA+	18,64	5,45858869	2,23
CD8+CD11altoRA+	18,10	5,76136558	2,35
CD8+CD11bajoRA+	4,41	3,05692033	1,25
CD8+CD11altoRO+	15,23	5,00723286	2,04
CD4+CD49d	9,57	2,21578802	
CD8+CD49d	NT		

Experimento 2: poblaciones de células T fueron evaluadas en sangre periférica de individuos HIV negativos que desarrollaron (pl+) o no desarrollaron (pl-) placas ateroscleróticas (arteria carótida) según fue determinado por evaluaciones por ecografía doppler. Los datos se presentan en la tabla III y figura 2.

Las observaciones iniciales de los presentes inventores fueron hechas en pacientes infectados de HIV. Como HIV es una deficiencia inmunológica, es posible que las diferencias en poblaciones de linfocitos observadas en pacientes infectados de HIV no puedan ser exactamente reflejadas en individuos no infectados por HIV. Por consiguiente, los inventores estudiaron poblaciones de linfocitos en pacientes que no tenían ninguna otra enfermedad pero con un diagnóstico positivo de grosor de la íntima como fue determinado por ecografía Doppler y en controles saludables como fue confirmado por ecografía Doppler.

ES 2 361 214 T3

5 Cuando estos datos fueron comparados con aquellos para pacientes infectados de HIV, fue observado que varios de los marcadores de poblaciones de linfocitos fueron alteradas en la misma dirección (es decir, frecuencia aumentada o disminuida en pacientes que desarrollaron placas contra pacientes que no lo hicieron) en los pacientes no infectados por HIV como se observó previamente en los pacientes infectados de HIV. Los pacientes de HIV + en el experimento 1 estaban en una fase avanzada de la enfermedad de HIV y fueron tratados con inhibidores de proteasa que debían ser asociados con un aumento estadísticamente significativo en el riesgo de enfermedad cardiovascular. La enfermedad de HIV es una inmunodeficiencia y se prevé que una alteración espectacular en marcadores de linfocitos sea progresivamente superior con la enfermedad avanzada. La uniformidad de cambios en poblaciones múltiples de linfocitos en pacientes ateroscleróticos ambos experimentos son sorprendentes en la vista de las discrepancias previstas entre la población infectada de HIV inmunodeficiente y pacientes no infectados de HIV. Por consiguiente, estos datos confirman la utilidad de cambios en estas poblaciones de linfocitos como marcadores para aterosclerosis.

15 Había algunas discrepancias entre los resultados de Experimento 1 (pacientes infectados de HIV) y experimento 2 (no infectados de HIV), pero esto ocurrió en poblaciones de linfocitos conocidas por ser afectadas por HIV.

20 Poblaciones de linfocitos que fueron observadas para ser alteradas en la misma dirección para pacientes que desarrollaron placas tanto en los estudios de pacientes infectados de HIV como no infectados son los marcadores de diagnóstico más prometedores para aterosclerosis. No obstante, puede ser discutido que poblaciones de linfocitos que fueron observadas para alterarse en direcciones opuestas en los dos experimentos pueden todavía ser útiles como marcadores ya que un cambio observado de esta población en un paciente en cualquier dirección podría ser una indicación de que una investigación ulterior está garantizada.

25 De manera interesante, poblaciones monocíticas que expresan CD86 y CD80 fueron encontradas para ser disminuidas en pacientes con aterosclerosis. Estas reducciones pueden ser una reflexión de migración de monocitos en placas ateroscleróticas.

30 Tabla III a y b muestran un análisis fenotípico de varias subpoblaciones de linfocitos diferentes en sangre periférica de individuos que desarrollaron placas ateroscleróticas (ATHERO1) y controles saludables (HC) en la parte a y niveles de citoquina plasmáticas en la parte b. Cabe destacar que como niveles previstos de MCP-1 fueron más altos en pacientes de aterosclerosis en comparación con controles saludables.

35 (Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

paciente	CD8/CD11a	CD8/CD11a/CD45RA	CD8/CD11/CD45RA	CD8/CD11/CD45RO	CD14/CD86	CD14/CD80	CD14/TLR2	CD14/TLR4	CD14/CD36
ATHERO1									
1	42.5	18.7	2.14	78.12	33.7	72	89	16.7	83.5
2	48	7.44	0.55	82.02	85.8	80.6	98.4	33.3	99.7
3	18.4	25.5	5.52	67.32	78.1	67.8	98.2	41.9	99.8
4	12.3	15.3	12.8	71.9	83.5	76.6	98.7	85	98.9
5	10.1	24.6	21.4	54	78.5	73.1	98.6	75.9	98.6
6	8.55	25.6	19.8	54.8	83.8	63.3	100	41.8	98.7
7	13.9	28.5	34.9	33.72	89.9	37.2	100	72.6	86.5
8	6.57	13.8	38.1	48.1	90	57.8	99.7	49.8	95.1
9	22.5	37.5	11.4	39.97	63	59.3	99.5	2.75	97.3
10	11.2	25.5	34.6	31.03	85.1	73.9	99.9	3.45	97.8
HC									
1	8.84	39.3	27.3	41.23	82.2	83	100	56	96.5
2	6.15	33.3	25.5	50.11	97	87.2	99.6	55.7	98.2
3	14.4	15.8	34.1	40.24	86.7	78.2	99.5	21.3	97.7
4	11.7	16.8	42.8	3.38	86.4	84.9	100	34.8	98.7

	CD8/CD11a	CD8/CD11a/CD45RA	CD8/CD11/CD45RA	CD8/CD11/CD45RO	CD14/CD86	CD14/CD80	CD14/TLR2	CD14/TLR4	CD14/CD36
ATHERO									
media	19.98	21.89	16.29	62.60	73.17	65.11	98.46	49.18	94.55
mediana	13.90	24.60	12.80	60.96	78.30	67.65	99.60	45.85	97.00
sd	14.34	9.11	13.51	18.63	16.76	16.12	0.49	27.16	5.92
sb	4.78	3.04	4.50	6.21	5.59	5.37	0.16	9.05	1.97
HC									
media	10.46	26.16	32.86	40.52	90.08	81.44	98.82	34.21	97.98
mediana	11.20	26.50	34.10	40.24	89.40	83.00	99.90	34.60	97.80
sd	3.11	10.21	6.86	6.76	4.72	5.36	0.20	22.64	1.04
sb	1.56	5.11	3.43	3.38	2.36	2.68	0.10	11.32	0.52

prueba-T	CD8/CD11a	CD8/CD11a/CD45RA	CD8/CD11/CD45RA	CD8/CD11/CD45RO	CD14/CD86	CD14/CD80	CD14/TLR2	CD14/TLR4	CD14/CD36
ATHERO vs H	0.175241575	0.446437611	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.000000000	0.143107564	0.309772197	0.228797111

Tabla IIIb: Citoquinas plasmáticas (pg/ml)

paciente	s-ICAM-1	s-VCAM-1	RANTES	MIP-1 alfa	MIP-1 beta	MCP-1	IL-1	IFN-alfa	TNF-alfa
ATHERO	1	29.7	2498.5	4.8	20.2	83.6	0	0	0
	2	28.5	3304.8	8.9	123.6	186.0	1	17.2	7.5
	3	27.8	3321.2	16.0	52.2	110.8	0	50	1.3
	4	20.9	317	3272.0	5.9	73.8	158.0	0	0
	5	13.9	35.4	3274.2	6.5	68.2	65.0	0	2000
	6	32.7	31.7	3432.2	8.9	53.6	92.5	0	6.7
	7	16.7	29.7	3450.8	12.5	101.8	51.9	0	6.5
	8	17.9	32.5	3263.8	1.8	24.3	152.4	0	12.5
	9	21.1	25.6	2903.1	6.5	32.3	104.4	0	12.5
	10	19.1	47.8	2876.3	1.8	34.0	64.5	0	6.2
HC	1	23.1	33.9	3255.6	2.4	91.6	99.1	0	6.3
	2	14.9	29.8	3357.7	6.5	46.3	78.8	0.1	6.2
	3	15.9	32.1	3281.7	5.3	49.9	60.0	0	6.2
	4	11.6	25.7	3304.8	1.2	69.9	39.3	0	41.7
	5	20.0	37.7	3368.9	46.3	26.4	2.8	0	228.1

ATHERO	media	22.83	36.71	3159.69	7.36	58.39	106.92	0.10	211.16	1.85
	mediana	20.99	33.96	3273.10	6.53	52.86	98.45	0.00	9.60	0.00
	sd	6.35	8.22	302.95	4.45	34.04	45.07	0.30	628.70	3.87
	se	2.12	2.74	100.98	1.48	11.35	15.02	0.10	209.57	1.29
HC	media	17.09	31.83	3313.74	12.35	56.82	55.99	0.02	57.70	0.00
	mediana	15.87	32.10	3304.80	5.34	49.92	60.02	0.00	6.30	0.00
	sd	4.49	4.49	48.64	19.11	24.83	37.08	0.04	96.50	0.00
se	2.25	2.24	24.32	9.55	12.42	16.54	0.02	48.25	0.00	

prueba-T	s-ICAM-1	s-VCAM-1	RANTES	MIP-1 alfa	MIP-1 beta	MCP-1	IL-1	IFN-alfa	TNF-alfa
ATHERO vs HC	0.096237187	0.2425894	0.28734583	0.431848651	0.92870151	0.004379982	0.5948942	0.60314087	0.28809286

TABLA IV

Marcadores de linfocitos citados en experimentos 1 y 2

Marcador	Descripción	Experimento 1 en HIV+ pts PI+ vs. pl-	Experimento 2 en HIV neg pts PI+ vs. PL-
CD8+CD25+	CD25 es el receptor para IL- 2 y su expresión se correlaciona con inflamación. Linfocitos de expresión de CD25 son linfocitos activados (un índice indirecto de inflamación)	Reducción en pl+ cuando se compara con HIV+ pero no cuando se compara con controles saludables	Aumento en pl+
CD4+CD25+	CD25 es el receptor para IL- 2 y su expresión se correlaciona con inflamación. Linfocitos de expresión de CD25 son linfocitos activados (un índice indirecto de inflamación)	Aumento en pl+	Ningún cambio en PI+
CD8+DRII+	DRII se expresa por CD4 y CD8 tras la activación. Linfocitos de expresión de DRII: mismo valor que CD25	Aumento en pl+	Aumento en pl+
CD4+DRII+	DRII se expresa por CD4 y CD8 tras la activación. Linfocitos de expresión de DRII: mismo valor que CD25	Aumento en pl+	Aumento en pl+
CD4+CD44+	CD44 (M-CAM) es una molécula de adhesión: linfocitos en circulación se adhieren a las células endoteliales; esto facilita su penetración en el endotelio	Aumento en pl+	Reducción en PI+
CD8+CD44+	CD44 (M-CAM) es una molécula de adhesión: linfocitos en circulación se adhieren a las células endoteliales; esto facilita su penetración en el endotelio	Aumento en pl+	Ningún cambio en pl+
CD4+CD11a+	CD11 a es cadena de integrina alfa. importante para adhesiones intercelulares, y señalización coestimulante	Aumento en pl+	Aumento en pl+
CD8+CD11a+	CD11 a es cadena de integrina alfa. importante para adhesiones intercelulares, y señalización coestimulante	Aumento en pl+	Aumento en pl+
CD4+CD62L+	CD62L es una adhesina (L selectina). Un marcador de adhesión expresado en CD4 y utilizado por estas células para adherirse a las altas vénulas endoteliales (HEV) y penetrar en la pared vascular.	Aumento en pl+	Aumento en pl+
CD8+CD62L+	CD62L es una adhesina (L selectina). Un marcador de adhesión expresado en CD8 y utilizado por estas células para adherirse a las altas vénulas endoteliales (HEV) y penetrar en la pared vascular.	Aumento en pacientes pl+	No realizado
CD8+CD38+CD45RO+	Linfocitos T activados por memoria: un índice indirecto de inflamación y activación inmunológica	Aumento en pacientes pl+	No realizado
CD8+CD28-CD45RA+	supresor T, células productoras de IL-10: cuanto inferior sea su valor peor será la condición inflamatoria	Ningún cambio	No realizado
CD4+CD3+CD45RO+	Linfocitos T activados por memoria: un índice indirecto de inflamación y activación inmunológica	Aumento en pl+	No realizado
CD4+CD62L+CD45RA+	Linfocitos T ingenuos	Ningún cambio	No realizado
CD8+CD11alto+CD45RA+	CD11 es una molécula de adhesión: linfocitos en circulación se adhieren a las células endoteliales; esto facilita su penetración en el endotelio	Ningún cambio	No realizado

5	CD8+CD11bajo +CD45RA+	CD11 es una molécula de adhesión. Células que expresan niveles bajos de la adhesina CD11 las hacen adherirse menos al endotelio.	Reducción en PI+	Reducción en PI+
	CD8+CD11a+C D45RA+	CD11 a es una cadena de integrina alfa importante para adhesiones intercelulares, y señalización coestimulante	No realizado	Ningún cambio
10	CD8+CD11alto +CD45RO+	CD11 es una molécula de adhesión: linfocitos en circulación se adhieren a las células endoteliales; esto facilita su penetración en el endotelio	Aumento en pacientes PI+	No realizado
15	CD8+CD11bajo +CD45RO+	CD11 es una molécula de adhesión; éstas son células T CD8 que aumentan en inflamación.	No realizado	Aumento en pi+
	CD4+CD49d+	CD49 (VLA-4 alfa) es una molécula de adhesión: linfocitos en circulación se adhieren a las células endoteliales; esto facilita su penetración en el endotelio	Aumento en pacientes PI+	Reducción en PI+
20	CD8+CD49d+	CD49 (VLA-a alfa) es una molécula de adhesión: linfocitos en circulación se adhieren a las células endoteliales; esto facilita su penetración en el endotelio	Ningún cambio	No realizado
25	CD14+CD86+	CD86 es también conocido como B7.2 se enlaza a Cd28 responsable de la coestimulación de células T, se considera ser principalmente TH2	No realizado	Reducción en PI+
	CD14 +CD80+	CD80 es también conocido CD80 también conocido como 87.1; se considera ser principalmente TH1	No realizado	Reducción en PI+
30	CD14 +TLR2+	Receptor TLR2= TLR	No realizado	Ningún cambio
	CD14 + TLR4+	Receptor TL4=TLR	No realizado	Ningún cambio
	CD14 + CD36+	CD36 es marcador de activación	No realizado	Ningún cambio

Preferiblemente, el método incluye la etapa posterior de evaluación del espesor de la íntima vascular para valorar si hay un grosor que puede ser indicativo de la presencia o probabilidad de aterosclerosis o placas ateroscleróticas. Para conseguirlo se prefiere que otras técnicas no invasivas tales como ultrasonografía, incluyendo técnicas de ultrasonidos de Doppler, se usen conjuntamente con el método de la presente invención. Además, la presente invención se puede utilizar como una sustitución de o además de técnicas de representación por imágenes invasivas convencionales.

Los inventores han mostrado que alteraciones en los parámetros anteriormente descritos, en particular, cambios en poblaciones de células T tales como CD8+/CD11L+/CD45RA+, CD8+/CD11L +/CD45RO+, CD8+CD11a+, CD8+CD62L+, CD8+CD38+RO+, evaluadas junto con CD4+CD3+RO+, CD8+CD11altoRO+, CD4+CD62L+, CD4+CD49d+, CD4+CD25+, CD4+DRII+, CD4+CD44+, son indicativos de formación de placas. Cuando el análisis según la invención indica un alto riesgo de que una placa se ha formado o es inminente, esto se puede confirmar por prueba invasiva. Ventajosamente, la prueba según la invención es realizada primero en intervalos regulares y la prueba invasiva sólo se realiza si se observa una frecuencia aumentada para una o más de las poblaciones de células indicadoras.

Está previsto que los datos del método de la invención sean interpretados usando software informático y representación gráfica.

Los métodos usados para medir células incluyen: marcar toda la sangre en un único tubo; lisar glóbulos rojos; y leer usando citometría de flujo. Alternativamente, las células marcadas se pueden adicionar a una fase sólida donde las células son contadas usando un analizador de imágenes y se utiliza un software personalizado para proporcionar salida automatizada de datos: la salida se puede confeccionar para comparar resultados únicos de los pacientes con una base de datos de resultados de individuos saludables y con una base de datos de datos de estadios variables de la enfermedad para facilitar una predicción precisa de formación de placas.

REIVINDICACIONES

5 1. Método para el diagnóstico, prognosis o identificación de una predisposición hacia aterosclerosis y la susceptibilidad al desarrollo de placas ateroscleróticas y/o obstrucción vascular, el método comprendiendo el análisis de una muestra para determinar la frecuencia en porcentaje de al menos dos subpoblaciones de linfocitos T y la comparación de los datos contra datos comparativos y/o de control, donde al menos una de dichas subpoblaciones de linfocitos T es una población de células T CD8 seleccionada de la lista que consiste en CD8+/CD11L+/CD45RA+, CD8+/CD11L+/CD45RO+, CD8+CD11 a+, CD8+CD62L+, CD8+CD11 altoRO+ y CD8+CD38+RO+, o una población de células CD4 T seleccionada de la lista que consiste en CD4+/62L+, CD4+CD49d+, CD4+CD25+, CD4+DRII+, CD4+CD44+ y CD4+CD3+RO+.

15 2. Método según la reivindicación 1, donde al menos una de dichas subpoblaciones de linfocitos T es una población de células T CD8 seleccionada de la lista que consiste en CD8+/CD11L+/CD45RA+, CD8+/CD11L+/CD45RO+, CD8+CD11 a+, CD8+CD62L+, CD8+CD11 altoRO+ y CD8+CD38+RO+ y al menos otra de dichas subpoblaciones de linfocitos T es una población de células T CD4 seleccionada de la lista que consiste en CD4+/62L+, CD4+CD49d, CD4+CD25+, CD4+DRII+, CD4+CD44+y CD4+CD3+RO+.

20 3. Método según la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde la muestra es una muestra de sangre o una biopsia.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que además comprende determinar la concentración de uno o más factores solubles intracelularmente, en plasma o en suero y comparar los datos obtenidos contra datos comparativos y de control.

25 5. Método según la reivindicación 4, donde dicho factor soluble es seleccionado del grupo que consiste en citoquinas y quimiocinas.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que además comprende uno o más de los pasos adicionales (a) y (b):

30 (a) determinar la frecuencia en porcentaje de células que expresan citoquinas de activación, y/o quimiocinas, y/o integrinas, y/o selectinas en la muestra;

(b) determinar la frecuencia de moléculas de superficie celular responsable de la activación celular

35 y comparar los datos obtenidos contra datos comparativos y de control.

40 7. Método según la reivindicación 5 o 6, en el que la citoquina es una o más de interleuquina-1 (o), interleuquina-2, interleuquina-3, interleuquina-4, interleuquina-5, interleuquina-6, interleuquina-7, interleuquina-8, interleuquina-9; interleuquina-10; interleuquina-11; interleuquina-12; interleuquina-13; interleuquina-14; interleuquina-15; interleuquina-16; interleuquina-17, interferon- α , interferon- β , interferon- γ , factores de necrosis tumoral tal como TNF- α y TNF- β (factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores estimuladores de colonias tales como G-CSF, GM-CSF, M-CSF, factores de crecimiento transformantes tal como TGF- β .

45 8. Método según la reivindicación 7, en el que las citoquinas son TNF- α , IL-12, interferon- α , FGF, y PDGF.

9. Método según la reivindicación 5 o 6, en el que las quimiocinas incluyen quimiocinas CC y CXC.

50 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método además comprende el paso adicional de determinación de la concentración de proteína 1 quimioatrayente de macrófagos (MCP-1) en una muestra del mismo paciente.

55 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método además comprende el paso adicional de determinar los cambios estadísticos en parámetros inmunológicos.

12. Método según la reivindicación 11, en el que el parámetro inmunológico es las proporciones de linfocitos.

60 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método además comprende el paso de evaluación del grosor de la íntima vascular para determinar si hay grosor que puede ser indicativo de la presencia o probabilidad de aterosclerosis o placas ateroscleróticas.

14. Método según la reivindicación 13, en el que la evaluación del espesor de la íntima vascular es por ultrasonografía.

65 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los datos son interpretados usando el software informático y representación de imágenes gráfica.

ES 2 361 214 T3

16. Método según la reivindicación 3, en el que análisis de la muestra de sangre comprende marcar toda la sangre en un único tubo.

5 17. Método según la reivindicación 16, en el que el análisis de la muestra de sangre comprende los otros pasos de lisar glóbulos rojos, y leer usando citometría de flujo.

18. Método según la reivindicación 16, en el que análisis de la muestra de sangre comprende los otros pasos de añadir las células marcadas a una fase sólida, y usar un analizador de imágenes para contar células.

10 19. Método según la reivindicación 17 o 18, en el que el software informático se utiliza para comparar resultados únicos de los pacientes con una base de datos de resultados saludables de los individuos y con una base de datos de datos de estadios variables de la enfermedad para facilitar una predicción precisa de la formación de placas.

15

20

25

30

35

40

45

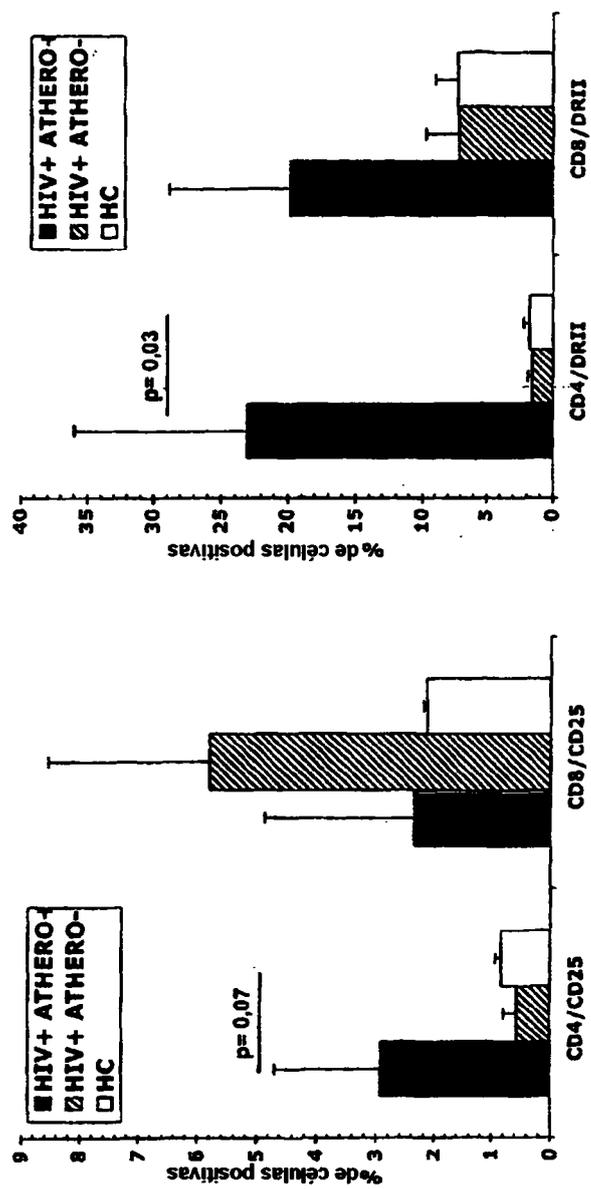
50

55

60

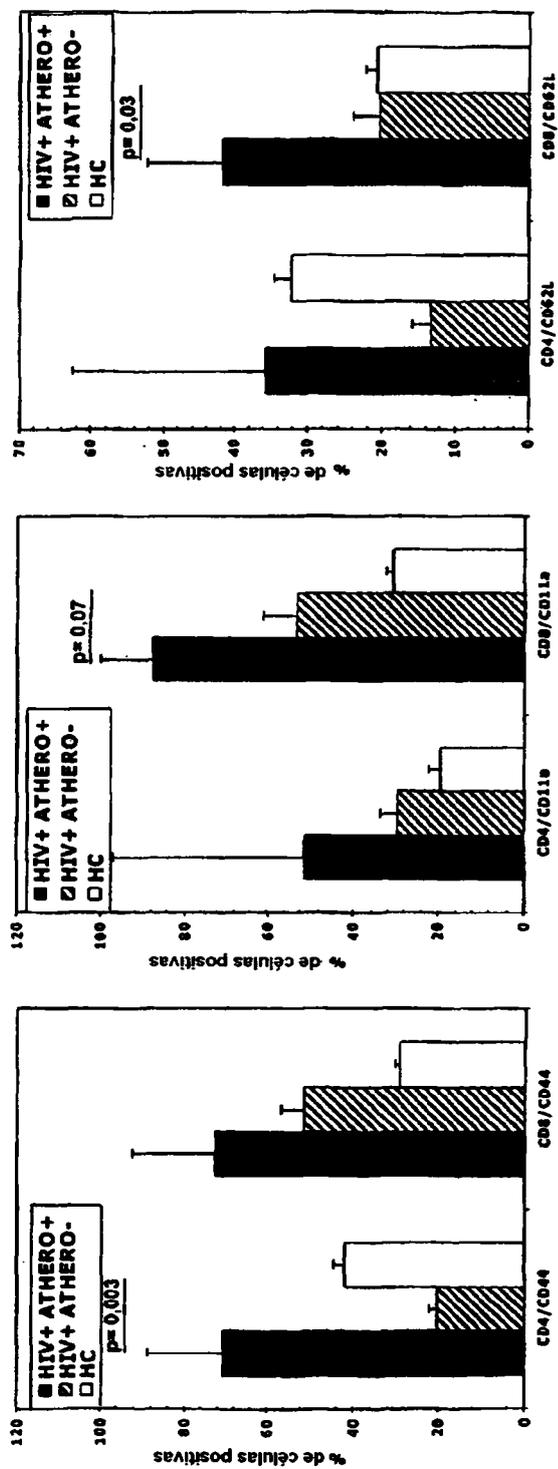
65

Fig. 1a



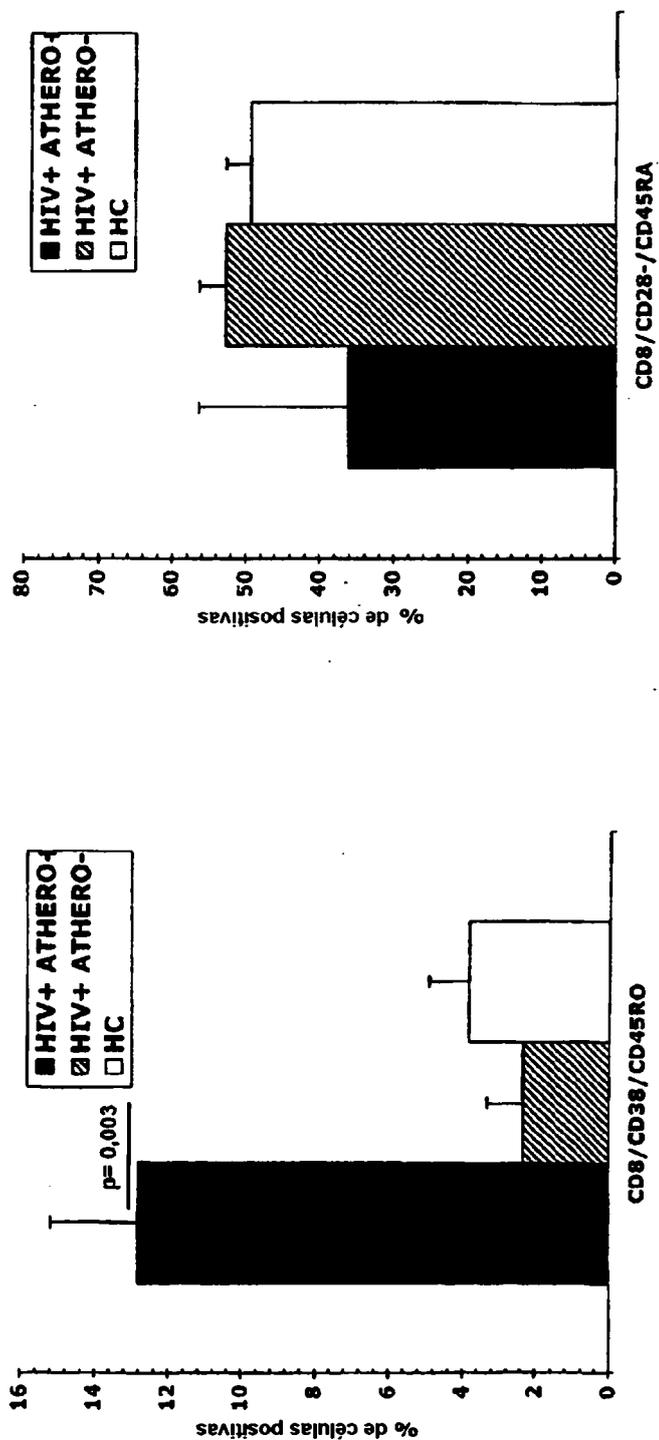
valores medios \pm SE

Fig. 1b



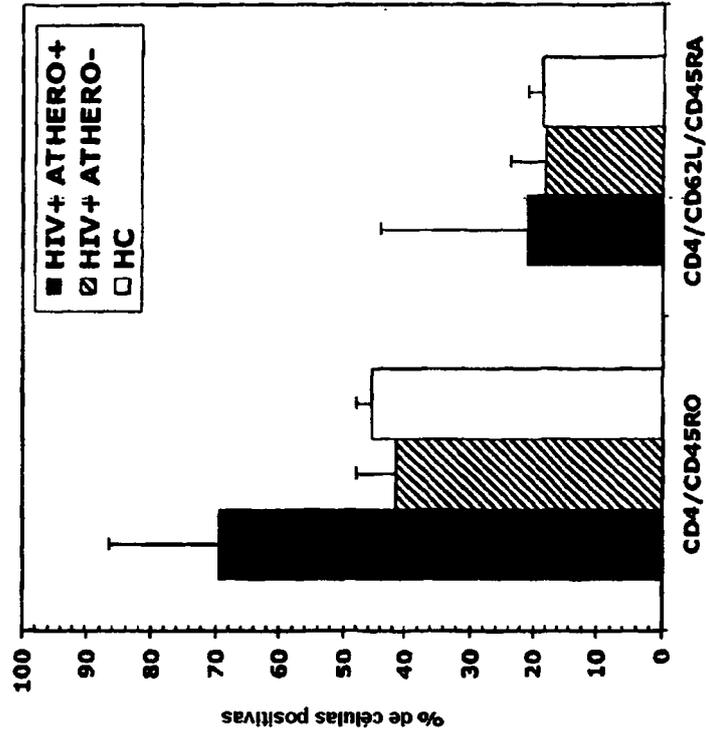
valores medios \pm SE

Fig. 1c



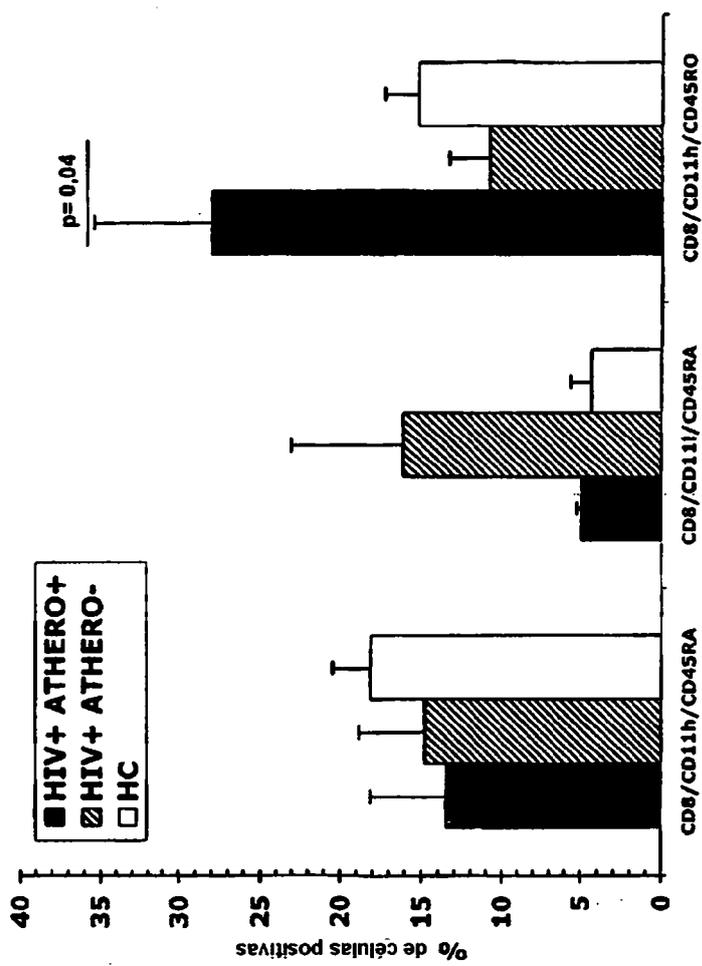
valores medios \pm SE

Fig. 1d



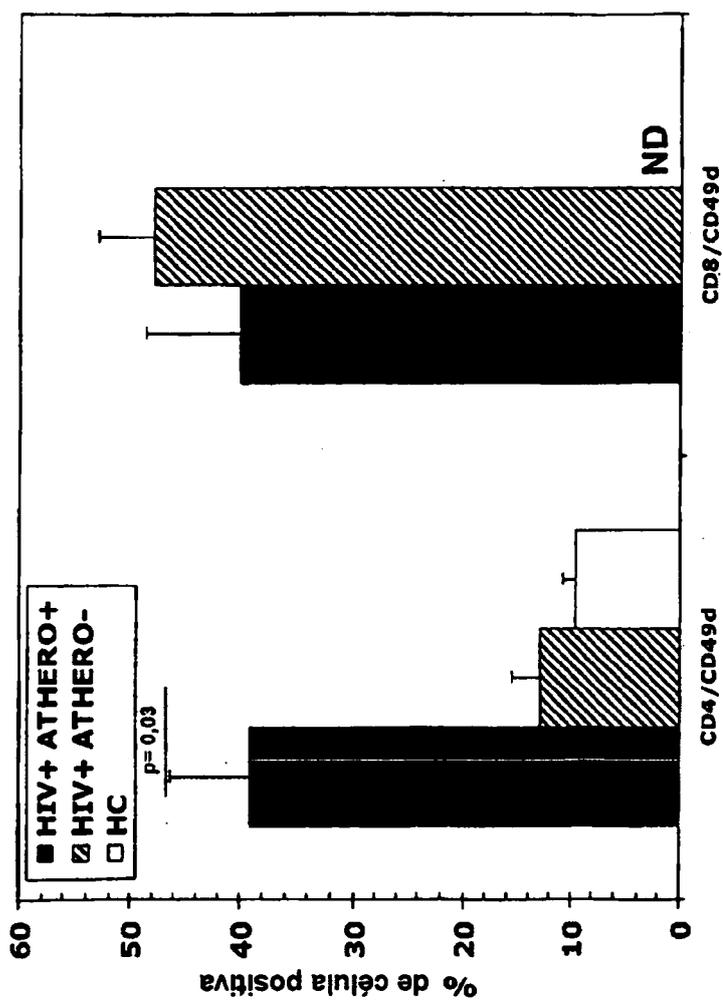
valores medios + SE

Fig. 1e



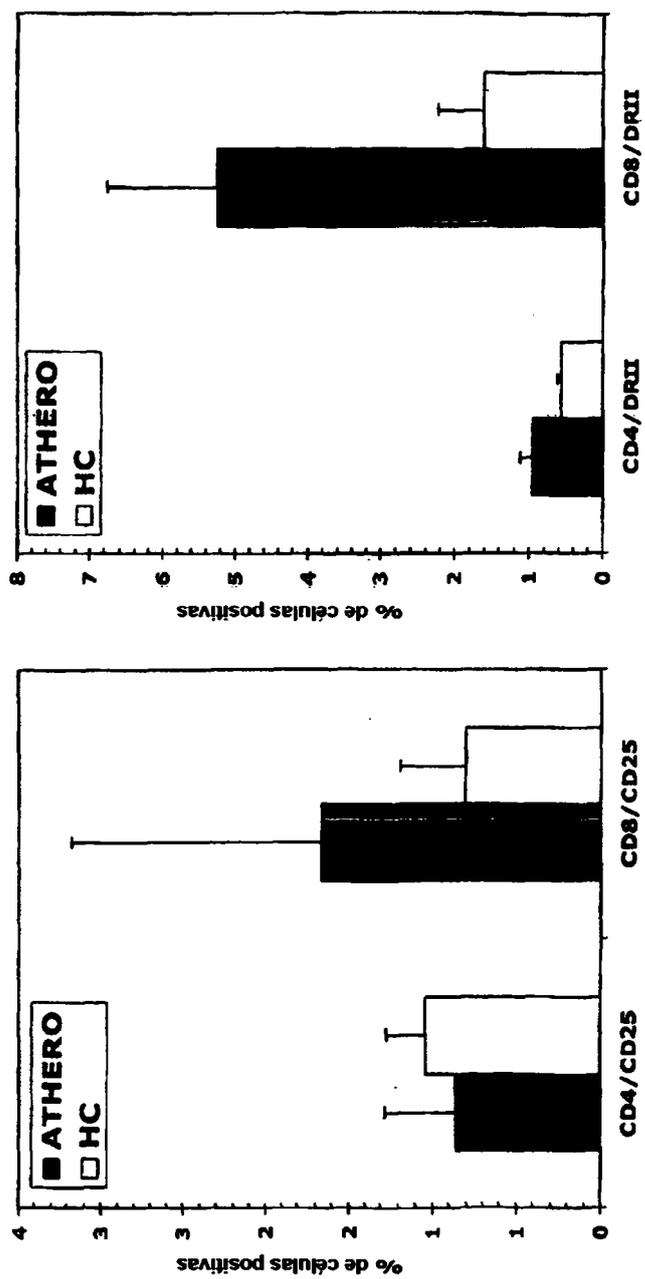
valores medios \pm SE

Fig. 1f



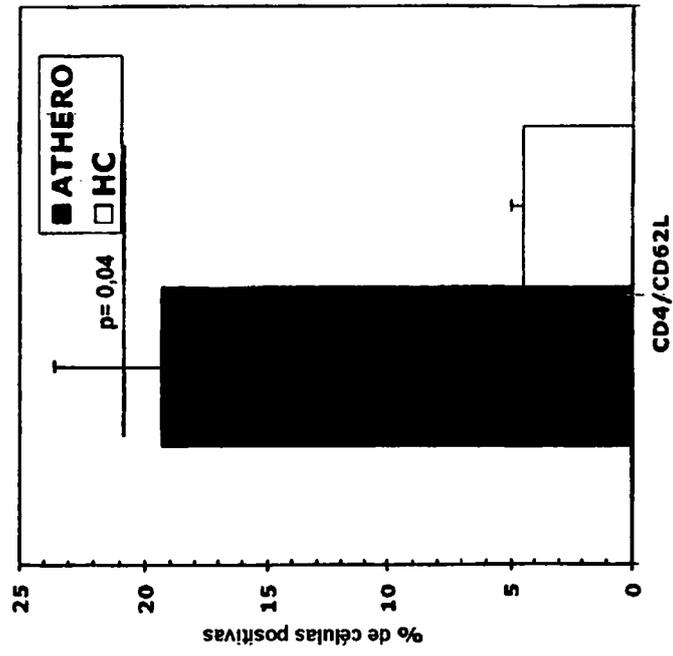
valores medios \pm SE

Fig 2.a



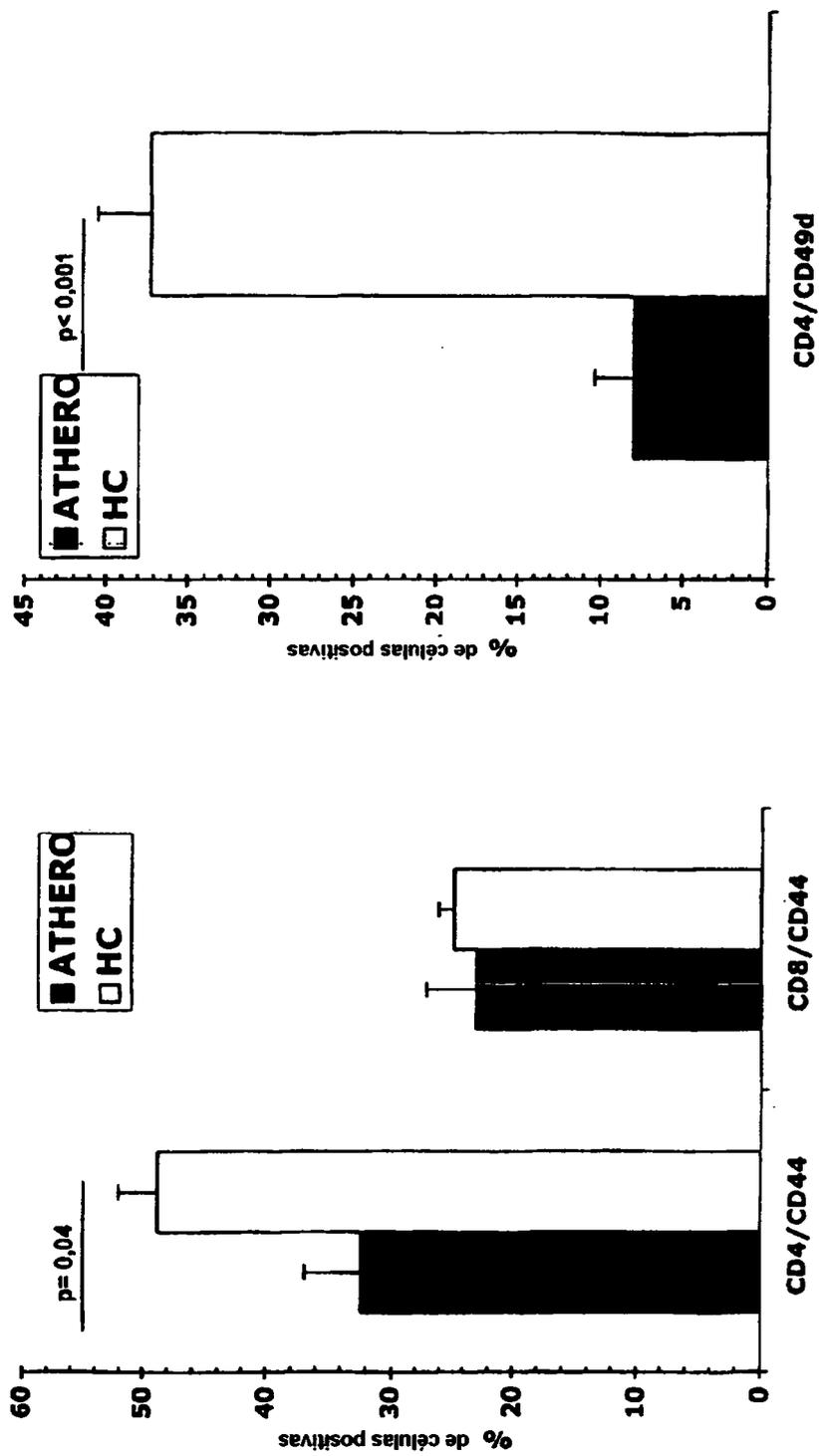
valores medios \pm SE

Fig 2. b



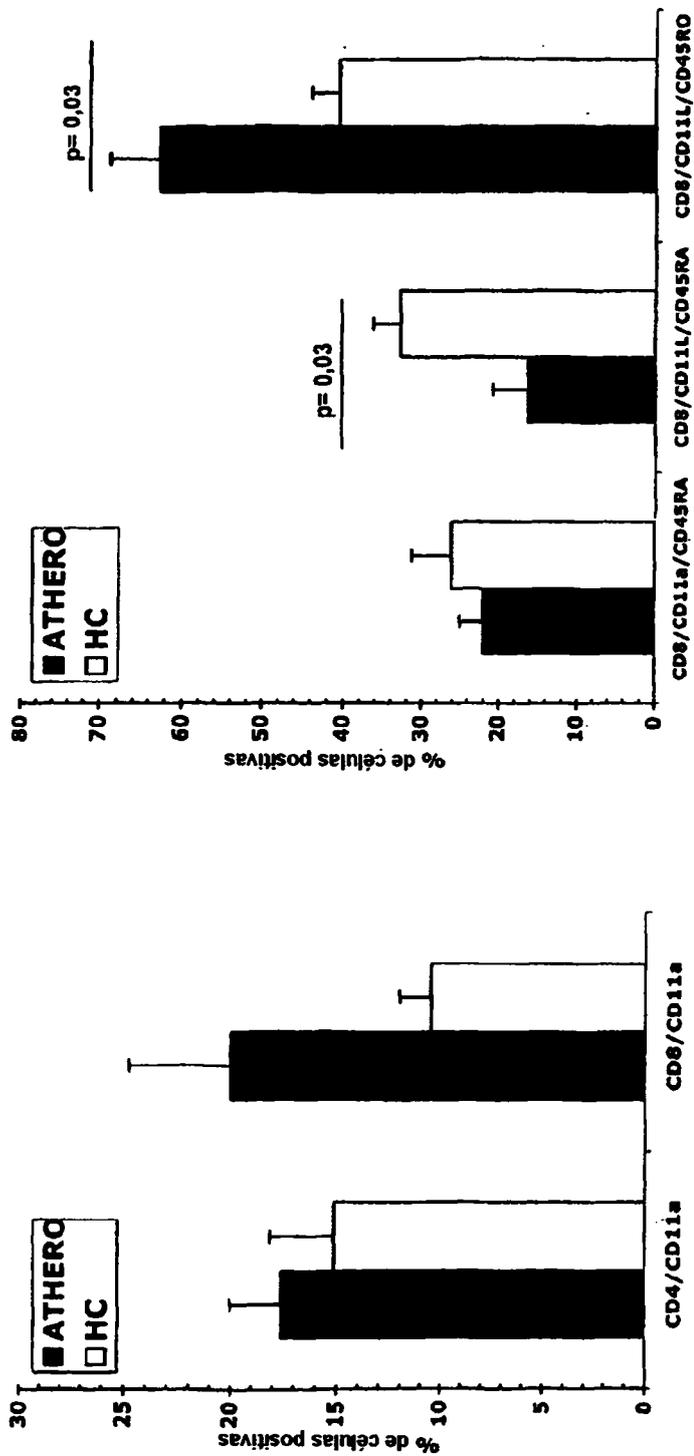
valores medios \pm SE

Fig 2. c



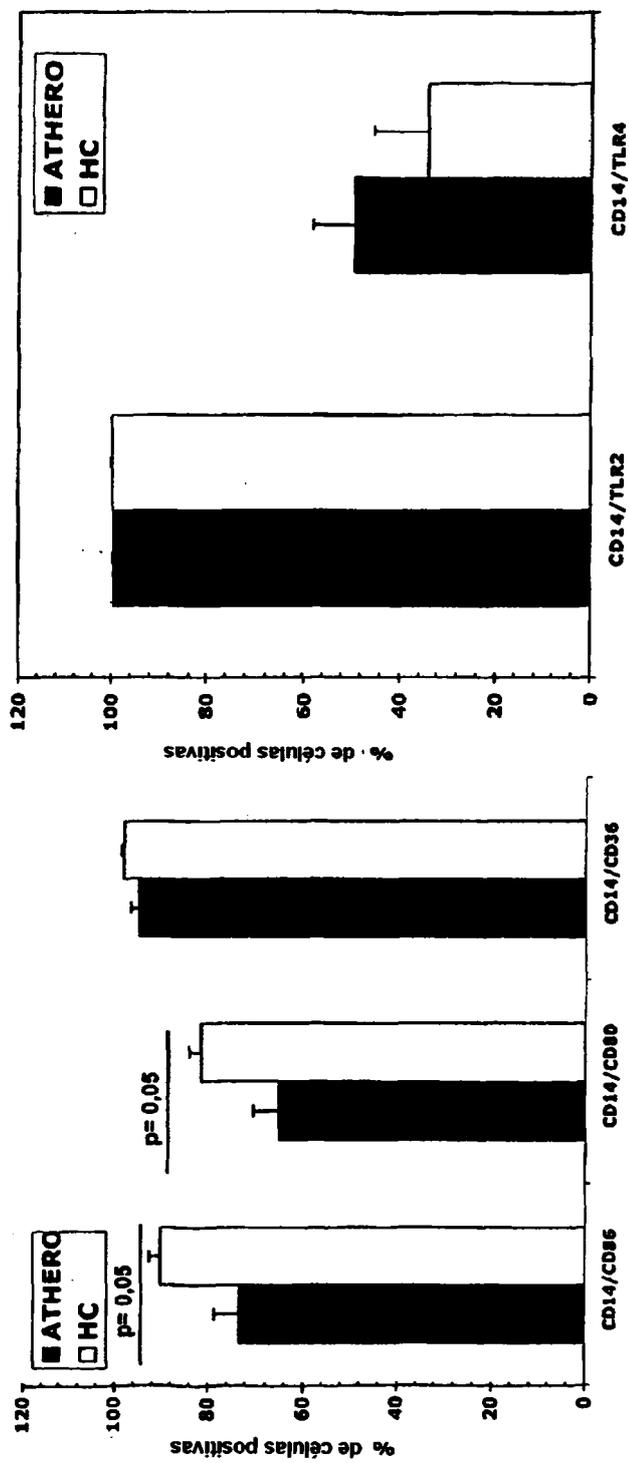
valores medios \pm SE

Fig 2. d



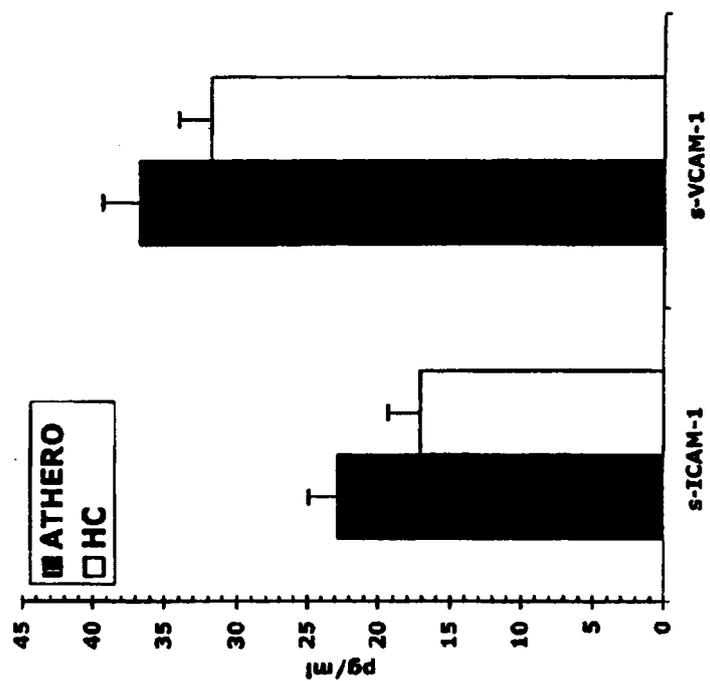
valores medios \pm SE

Fig 2. e



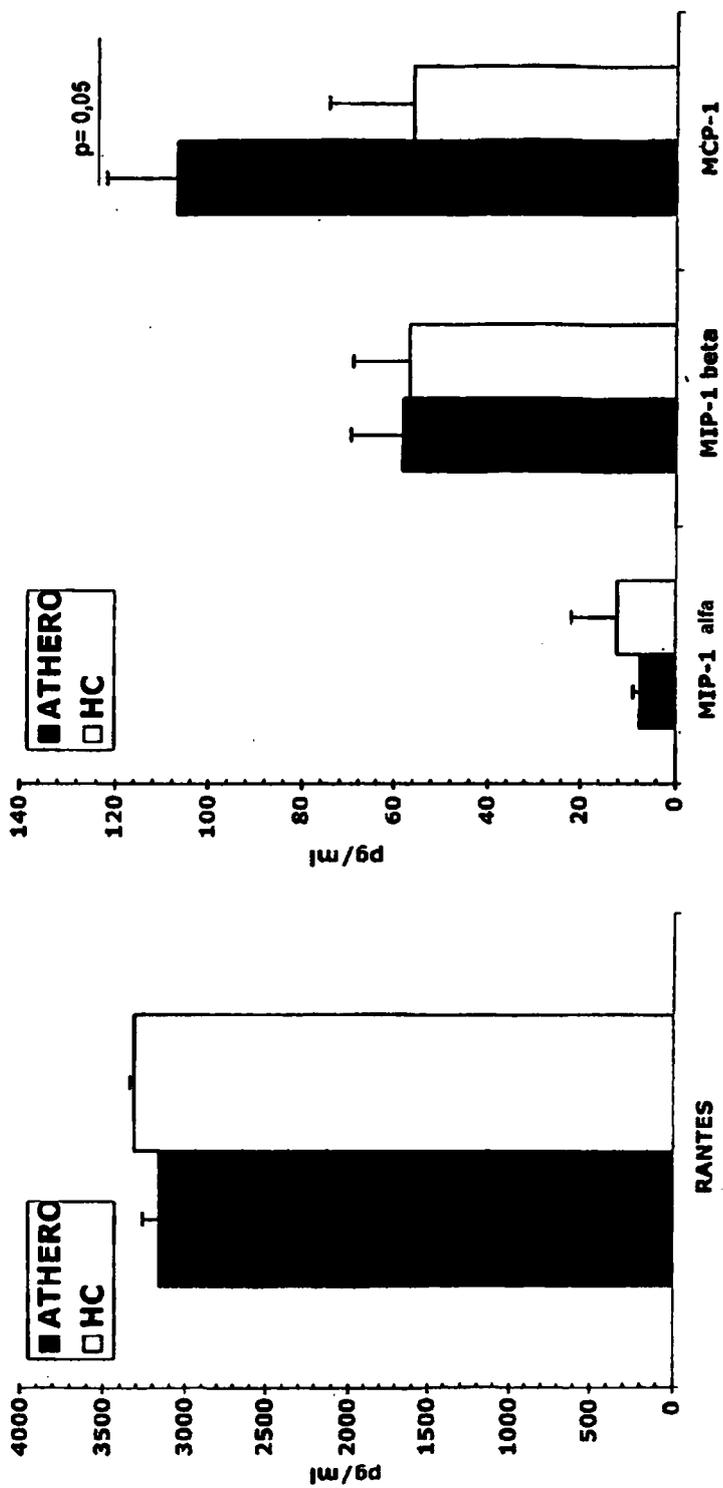
valores medios \pm SE

Fig 2. f



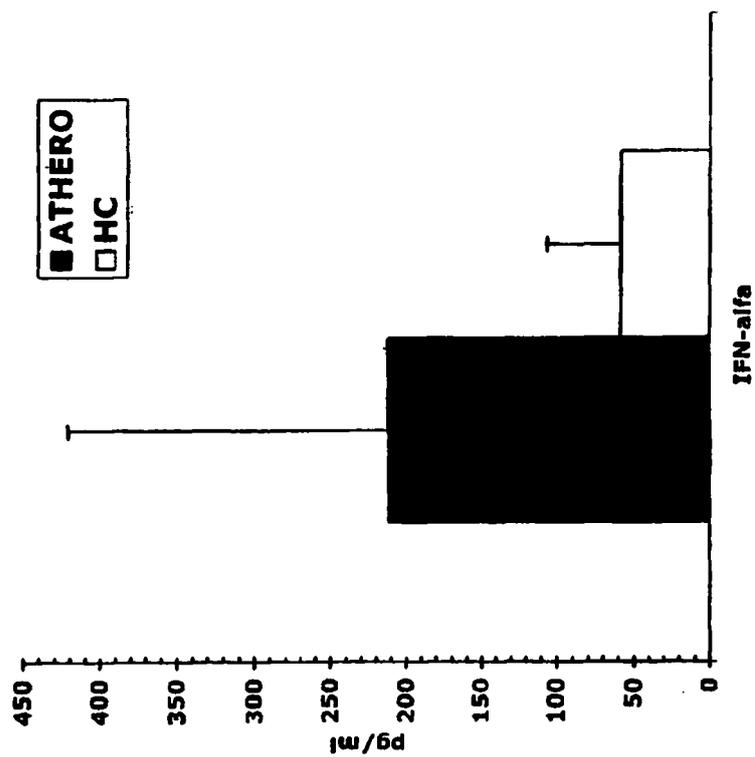
valores medios \pm SE

Fig 2. g



valores medios \pm SE

Fig 2. h



valores medios \pm SE