

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 380**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2009 E 09772456 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2318842**

54 Título: **Detección de CD31 diseminada, diagnóstico de aterotrombosis y trastornos autoinmunitarios, y procedimientos para analizar rutas de señalización**

30 Prioridad:

30.06.2008 EP 08305361
09.02.2009 EP 09305116

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

10.05.2016

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (100.0%)**
101 Rue de Tolbiac
75013 Paris, FR

72 Inventor/es:

**CALIGIURI, GIUSEPPINA y
NICOLETTI, ANTONINO**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 569 380 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

Detección de CD31 diseminada, diagnóstico de aterotrombosis y trastornos autoinmunitarios, y procedimientos para analizar rutas de señalización

5

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se origina a partir del descubrimiento de que el dominio extracelular de proteínas CD31 presentes en leucocitos sanguíneos se disemina y se libera en la circulación como una forma soluble de CD31. Un procedimiento para detectar CD31 diseminada se desvela adicionalmente. La solicitud desvela, por lo tanto, un procedimiento para detectar un ectodominio diseminado de una proteína transmembrana, tal como CD31, y el uso de dicho procedimiento como herramienta de diagnóstico. La solicitud desvela además procedimientos para determinar si una proteína candidata es parte de un complejo molecular.

10

ANTECEDENTES

15

CD31 (PECAM-1)

[0002] Las respuestas inmunitarias pueden estar controladas por receptores inmunitarios inhibidores entre los cuales CD31 (PECAM-1), que se expresa exclusiva y constitutivamente en células en la interfaz sangre-vaso.

20

[0003] CD31 consiste en una molécula monocatenaria que comprende 6 dominios extracelulares similares a Ig, un corto segmento transmembrana y una cola citoplasmática que contiene dos motivos inhibidores basados en inmunotirosina (ITIM). La estructura de CD31 se muestra en la tabla a continuación.

25

Dominio	Posición en la SEQ ID No: 1
Péptido señal	1 a 27
Dominio extracelular	28 a 601
Primer dominio extracelular similar a Ig	34 a 121
Segundo dominio extracelular similar a Ig	145 a 233
Tercer dominio extracelular similar a Ig	236 a 315
Cuarto dominio extracelular similar a Ig	328 a 401
Quinto dominio extracelular similar a Ig	424 a 493
Sexto dominio extracelular similar a Ig	499 a 591
Dominio yuxtamembrana	592 a 601
Dominio transmembrana	602 a 620
Dominio citoplasmático	621 a 738

[0004] Las supuestas propiedades inmunorreguladoras consecuentes de CD31 están apoyadas por el hecho de que la señalización de CD31 impulsa la repulsión mutua de leucocitos sanguíneos y modula el equilibrio entre señales inhibitoras y estimuladoras de células inmunitarias tanto innatas como adaptativas. El ensamblaje mecánico de los dominios extracelulares similares a Ig distales de CD31 induce señalización inhibitora de fuera a dentro activada por la fosforilación de sus ITIM, y el reclutamiento y la activación de fosfatasas que contienen SH2.

30

[0005] Zehnder y col. (1995, Blood. 85(5): 1282-8) identificaron un anticuerpo para CD31 que inhibía la reacción linfocítica mixta (MLR) de una manera específica y dependiente de la dosis. Descubrieron además que un péptido CD31 correspondiente al epítipo de este anticuerpo, es decir a los 23 aminoácidos proximales a la membrana de CD31, inhibía fuertemente la MLR. Formularon la hipótesis de que los 23 aminoácidos proximales a la membrana de CD31 es una región funcionalmente importante, y que el péptido CD31 interfiere en la activación de

35

los linfocitos compitiendo por epítomos de unión. Sin embargo, Zehnder y col., no consiguen enseñar si la señalización mediada por CD31 es activada o inhibida por el péptido CD31.

5 [0006] Chen y col. (1997, Blood. 89(4): 1452-9) mostraron que este péptido retardaba el inicio de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) e incrementaba la supervivencia a largo plazo en un modelo murino de la enfermedad. Formularon la hipótesis de que el péptido CD31 inhibe una ruta común en la activación de células T. De nuevo, Chen y col., no consiguieron elucidar el papel desempeñado por el péptido CD31 en la activación de células T. En particular, estos trabajos previos no valoraron el supuesto efecto del péptido sobre la cascada de señalización de CD31 y de forma más precisa sobre el estado de fosforilación de los ITIM de CD31.

10 [0007] Para un mecanismo aún desconocido, CD31 se “pierde” en ciertos linfocitos circulantes. Su pérdida se observa en el momento de la activación de linfocitos y se ha demostrado recientemente que la ausencia de señalización de CD31 en linfocitos, a su vez, eleva las respuestas inmunológicas patológicas implicadas en el desarrollo de aterotrombosis.

15 [0008] Una forma soluble de CD31, debido a un transcrito variante que carece del dominio transmembrana, también ha sido descrita y, por lo tanto, actualmente se cree que la cantidad individual de CD31 circulante está determinada genéticamente. En consecuencia, una serie de estudios previos han intentado descubrir una correlación entre los niveles en plasma de CD31 soluble y el riesgo de aterotrombosis u otras enfermedades autoinmunitarias. Sin embargo, independientemente de los polimorfismos genéticos específicos analizados, los datos mostraron un amplio intervalo de valores de CD31 plasmático y los resultados de estos diferentes estudios fueron contradictorios.

20 [0009] Existe, por lo tanto, una necesidad de entender mejor la función biológica de CD31. Esto permitiría la provisión de mejores herramientas para el diagnóstico de enfermedades vinculadas con la activación de células T tales como trastornos trombóticos y autoinmunitarios.

25 [0010] Minagar y col. (2000, Abstracts of the Society of Neuroscience, 26: 1-2) describen la detección de una forma soluble de CD31 en el sobrenadante de un cultivo de CMVEC (*células endoteliales microvasculares cerebrales*) en presencia de plasma de pacientes que padecen esclerosis múltiple.

Procedimientos para analizar rutas de señalización

30 [0011] Tres ensayos diferentes están disponibles actualmente para analizar rutas de señalización: coinmunoprecipitación seguida por Transferencia de Western (co-IP/WB), el ensayo ELISA de activación celular de señalización (CASE) y el ensayo CBA Flex set (BD).

35 [0012] En el ensayo co-IP/WB, las células se lisan y en primer lugar se lleva a cabo una extracción de proteínas. La proteína estudiada se coinmunoprecipita a continuación con proteínas con las que está asociada y se lleva a cabo una electroforesis en 2D. Finalmente, la membrana obtenida después de la transferencia de Western se hibrida con un anticuerpo marcado y la señal se detecta. Éste es, por lo tanto, un ensayo que requiere tiempo. La membrana puede deshíbridarse y rehibridarse con otro anticuerpo marcado, pero no más de cuatro veces. Por lo tanto, solamente pueden analizarse cuatro parámetros con una única muestra/membrana. Además, el ensayo co-IP/WB es un ensayo cualitativo pero no uno cuantitativo. Finalmente, el experto en la materia debe realizar dos ensayos co-IP/WB independientes si desea comparar proteínas asociadas con la proteína estudiada en un estado fosforilado con aquellas asociadas con la proteína estudiada en un estado no fosforilado.

40 [0013] Los ensayos CASE (Superarray) y Phosphlow (BD) son más sencillos y más rápidos que el ensayo co-IP/WB, dado que el anticuerpo marcado se añade a una muestra que comprende células permeabilizadas pero no lisadas. Además, no se necesita ninguna transferencia. Los anticuerpos están marcados con un fluoróforo (Phosphlow) o se detectan mediante una enzima (CASE), cuya actividad puede medirse fácilmente. Sin embargo, estos ensayos aún no permiten analizar muchos parámetros con una única muestra, dado que solamente están disponibles un número limitado de enzimas. Además, ambos ensayos son mucho menos específicos que el ensayo co-IP/WB, dado que la molécula estudiada no es capturada y, por lo tanto, no se puede determinar la interacción entre las diferentes moléculas de la ruta de señalización. Los ensayos Phosphlow y CASE solamente permiten determinar qué moléculas de una ruta de señalización dada están presentes en una célula, o presentes en un estado fosforilado en la célula.

45 [0014] El ensayo CBA Flex set (BD) permite la determinación simultánea de múltiples moléculas de

señalización pero no consigue permitir el análisis de complejos moleculares y, por lo tanto, la determinación de cascadas de señalización dependientes del receptor específicas es imposible.

5 **[0015]** Prevost y col. (2002, The Journal of Immunology, 169: 5679-5688) desvelan que sGMR α (*subunidad α del receptor GM-CSF soluble*) surge a través de corte y empalme alternativo o a través de la diseminación del ectodominio de la superficie celular GMR α .

10 **[0016]** El documento US2007/233391 desvela un procedimiento para diagnosticar un estado de enfermedad particular, comprendiendo dicho procedimiento medir el nivel de varias moléculas de CD diseminadas/solubles/secretadas a partir de un individuo.

[0017] El documento WO02/080968 desvela la clonación de GPVI y una forma recombinante soluble de GPVI, así como anticuerpos que se unen específicamente a GPVI.

15 **[0018]** Existe, por lo tanto, una necesidad de procedimientos mejorados para analizar rutas de señalización, que combine las respectivas ventajas de co-IP/WB, Phosphlow/CASE y CBA Flex set.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

20 **[0019]** En este contexto, se ha descubierto sorprendentemente que la supuesta pérdida de CD31 en linfocitos T activados/con memoria es en realidad incompleta y es el resultado de la diseminación de CD31 entre el 5^o y el 6^o dominios extracelulares similares a Ig. El dominio extracelular diseminado de CD31 (denominado además como "CD31 diseminada") es liberado a continuación a la circulación, donde está presente junto con una variante de corte y empalme soluble de CD31.

25 **[0020]** Además, se ha descubierto que un elevado riesgo de aterotrombosis está vinculado con el incremento del CD31 diseminada y la disminución de la variante de corte y empalme de CD31 en la circulación, y no con el nivel total de la CD31 circulante.

30 **[0021]** Este descubrimiento condujo a la provisión de una potente herramienta de diagnóstico. De hecho, dado que las pruebas que estaban disponibles en el mercado hasta la fecha detectaban CD31 plasmático a través del uso de anticuerpos dirigidos a los dominios 1 a 5 de CD31, éstas no podían discriminar entre la variante de corte y empalme soluble de CD31 (que contiene los 6 dominios extracelulares similares a Ig) y la forma diseminada de CD31 (que contiene los dominios 1 a 5 solamente). Por otro lado, el procedimiento sustractivo descrito en el
35 presente documento permite discriminar entre las dos formas de CD31 soluble y cuantificar de forma precisa la proporción de cada una de ellas en una muestra biológica.

40 **[0022]** Se ha descubierto además que este procedimiento sustractivo puede adaptarse para analizar formas solubles de proteínas transmembrana diferentes de CD31, y para analizar complejos moleculares y rutas de señalización, por ejemplo para determinar si una ruta de señalización está activada o no, y/o para determinar si una proteína candidata es parte de un complejo molecular.

45 **[0023]** La solicitud desvela, por lo tanto, procedimientos para detectar y/o cuantificar un ectodominio diseminado de una proteína transmembrana, procedimientos para diagnosticar si un individuo padece un trastorno trombótico o autoinmunitario, kits de diagnóstico, procedimientos para determinar si una ruta de señalización está activada, y procedimientos para determinar si una molécula candidata es parte de un complejo molecular, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

50 **[0024]** Los procedimientos desvelados en el presente documento presentan muchas ventajas en comparación con procedimientos de la técnica anterior, tales como detección de formas solubles mediante ELISA. En primer lugar, estos pueden replicarse de forma infinita. De hecho, cada perla representa una unidad de prueba individual, y el número de perlas adquiridas corresponde al número de réplicas. Las pruebas ELISA se llevan a cabo habitualmente por duplicado o triplicado. Sin embargo, con el procedimiento desvelado en el presente documento, al menos 300 réplicas (es decir, perlas citométricas) pueden adquirirse simultáneamente. En segundo lugar, los
55 procedimientos desvelados en el presente documento no requieren mucho tiempo, dado que pueden llevarse a cabo en aproximadamente 30 minutos. En tercer lugar, la cantidad de material de partida (es decir de muestra biológica) que es necesaria es muy baja (aproximadamente 5 μ g). En cuarto lugar, varias formas solubles diferentes pueden detectarse simultáneamente dentro de la misma muestra biológica. Finalmente, los procedimientos desvelados en el presente documento son más sensibles que el ELISA debido a la gama ampliada permitida por procedimientos

fluorescentes frente a colorimétricos.

[0025] La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

5 Detección de ectodominios diseminados

[0026] Se ha desarrollado un procedimiento que permite diferenciar entre diferentes isoformas solubles de una proteína. Este procedimiento se basa en el uso simultáneo de anticuerpos marcados con perlas citométricas y de anticuerpos marcados de forma fluorescente. Los anticuerpos marcados son detectados a continuación mediante citometría de flujo. En resumen, la muestra que comprende las isoformas solubles se pone en contacto con un primer anticuerpo marcado (denominado como el “anticuerpo de captura” o el “anticuerpo de señalización”) que se une a todas las isoformas solubles a analizar. La muestra también se pone en contacto con “anticuerpos discriminantes” marcados que se unen solamente a algunas de las isoformas solubles. La muestra se analiza a continuación mediante citometría de flujo y se calcula la proporción de cada una de las isoformas en dicha muestra.

[0027] Por lo tanto, la solicitud desvela un procedimiento para detectar un ectodominio diseminado de una proteína transmembrana entre formas solubles de dicha proteína transmembrana en una muestra biológica, en el que dichas formas solubles incluyen una variante de corte y empalme soluble de dicha proteína transmembrana y opcionalmente dicho ectodominio diseminado, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar un primer tipo de perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente tanto en dicho ectodominio diseminado como en dicha variante de corte y empalme;
- b) proporcionar al menos un segundo tipo de perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente en dicho ectodominio diseminado y ausente de dicha variante de corte y empalme, o presente en dicha variante de corte y empalme y ausente de dicho ectodominio diseminado;
- c) proporcionar un ligando marcado de forma fluorescente que se une específicamente a una región que está presente tanto en dicho ectodominio diseminado como en dicha variante de corte y empalme;
- d) poner en contacto dichos anticuerpos con una muestra biológica que es probable que contenga dichas formas solubles de dicha proteína transmembrana;
- e) para cada tipo de perla, medir la señal obtenida con dicha marca fluorescente mediante citometría de flujo; y
- f) comparar la señal obtenida para cada tipo de perla.

en el que una diferencia en las señales medidas en la etapa (e) indica que la muestra biológica comprende dicho ectodominio diseminado. En una realización preferida, la muestra biológica se pone en contacto en primer lugar con los anticuerpos enlazados a perlas, las perlas se recuperan a continuación y se ponen en contacto con el ligando marcado de forma fluorescente.

[0028] En el procedimiento anterior, el ectodominio diseminado se detecta usando solamente un único ligando marcado de forma fluorescente como ligando de señalización y al menos dos tipos de anticuerpos enlazados a perlas como anticuerpos discriminantes.

[0029] Como alternativa, los ectodominios diseminados pueden detectarse usando un tipo de ligando enlazado a perlas como ligando de captura y al menos dos anticuerpos marcados de forma fluorescente como anticuerpos discriminantes.

[0030] Dicho procedimiento para detectar un ectodominio diseminado de una proteína transmembrana entre formas solubles de dicha proteína transmembrana en una muestra biológica, en el que dichas formas solubles incluyen de una variante de corte y empalme soluble de dicha proteína transmembrana y opcionalmente dicho ectodominio diseminado, comprende las etapas de:

- a) proporcionar una perla enlazada a un ligando que se une específicamente a una región que está presente tanto en dicho ectodominio diseminado como en dicha variante de corte y empalme;

b) proporcionar un primer tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente tanto en dicho ectodominio diseminado como en dicha variante de corte y empalme;

5 c) proporcionar al menos un segundo tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente en dicho ectodominio diseminado y ausente de dicha variante de corte y empalme, o presente en dicha variante de corte y empalme y ausente de dicho ectodominio diseminado;

10 d) poner en contacto dichos anticuerpos con una muestra biológica que es probable que contenga dichas formas solubles de dicha proteína transmembrana;

e) para cada anticuerpo marcado de forma fluorescente, medir la señal obtenida con dicha marca fluorescente mediante citometría de flujo; y

15 f) comparar la señal obtenida para cada anticuerpo marcado de forma fluorescente;

20 en el que una diferencia en las señales medidas en la etapa (e) indica que la muestra biológica comprende dicho ectodominio diseminado. En este procedimiento, cada tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente está marcado con una marca diferente. Por lo tanto, la marca del segundo tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente es diferente de la marca del primer tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente. En el marco de este procedimiento, la perla está preferentemente marcada de forma no fluorescente. En una realización preferida, la muestra biológica se pone en contacto en primer lugar con el ligando enlazado a perlas, las perlas se recuperan a continuación y se ponen en contacto con los anticuerpos marcados de forma fluorescente.

25 **[0031]** Los procedimientos anteriores para detectar un ectodominio diseminado de una proteína transmembrana entre formas solubles de dicha proteína transmembrana en una muestra biológica pueden comprender además la etapa de calcular la proporción, el porcentaje y/o la cantidad de dichas formas solubles que corresponde a dicho ectodominio diseminado, y/o la etapa de comparar las señales medidas con las obtenidas con al menos una muestra biológica que comprende cantidades conocidas de dicho ectodominio diseminado y de dichas variantes de corte y empalme solubles, y/o la etapa de calcular la relación de ectodominio diseminado (o forma cortada y empalmada) con respecto a formas solubles (es decir todas las isoformas solubles o "formas solubles totales").

30

35 **[0032]** Tal como se usa en el presente documento, el término "perla" se refiere a una perla citométrica para uso en citometría de flujo. En el procedimiento según la invención, diferentes tipos de perlas se refieren a perlas distinguibles entre sí. Dichas perlas pueden corresponder por ejemplo a las BD™ Cytometric Beads comercializadas por BD Biosciences (San Jose, California). Las perlas se conocen bien en la técnica y se describen adicionalmente a continuación.

40 **[0033]** Los citómetros de flujo permiten la caracterización de partículas tomando como base la dispersión de la luz y la fluorescencia de partículas. En un citómetro de flujo, se analizan partículas individualmente exponiendo a cada partícula a una luz de excitación, típicamente uno o más láseres, y se miden las propiedades de dispersión de luz y fluorescencia de las partículas. Partículas, tales como moléculas, perlas unidas a analito, células individuales, o subcomponentes de las mismas, típicamente están marcadas con uno o más colorantes fluorescentes

45 espectralmente distintos, y la detección se lleva a cabo usando una multiplicidad de fotodetectores, uno para cada colorante distinto a detectar. Los citómetros de flujo están disponibles en el mercado de, por ejemplo, BD Biosciences (San Jose, Calif.). Pronto en el desarrollo de citometría de flujo, se reconoció que diversos tipos de ensayos de unión a ligando podrían llevarse a cabo usando perlas (también denominadas micropartículas) revestidas con un miembro de un par de unión. Las perlas revestidas e indicadores se incuban con una muestra que

50 contiene (o que se sospecha que contiene) el analito de interés para permitir la formación de complejos perla-analito-indicador. El análisis mediante citometría de flujo permite tanto detectar la presencia de complejos perla-analito-indicador y medir simultáneamente la cantidad de fluorescencia del indicador asociada con el complejo como medida cuantitativa del analito presente en la muestra. También se reconoció pronto en el desarrollo de citometría de flujo que el análisis simultáneo de múltiples analitos en una muestra podría llevarse a cabo usando un conjunto

55 de perlas distinguibles, cada tipo de perla revestido con un agente de unión específico de analito único. El conjunto de perlas y los reactivos indicadores marcados de forma fluorescente, uno para cada especie de analito a detectar, se incuban con una muestra que contiene los analitos de interés para permitir la formación de complejos perla-analito-indicador para cada analito presente, y los complejos resultantes se analizan mediante citometría de flujo para identificar y, opcionalmente, cuantificar los analitos presentes en la muestra. Dado que la identidad del analito

unido al complejo se indica mediante la identidad de la perla, múltiples analitos pueden detectarse simultáneamente usando el mismo fluoróforo para todos los reactivos indicadores.

[0034] Una serie de procedimientos de preparación y uso de conjuntos de micropartículas distinguibles se han descrito en la bibliografía. Estos incluyen perlas distinguibles por tamaño, en las que la micropartícula de cada tamaño se reviste con un anticuerpo específico de diana diferente (véase por ejemplo Fulwyler y McHugh, 1990, *Methods in Cell Biology* 33: 613-629), perlas con dos o más colorantes fluorescentes a concentraciones variables, en las que las perlas se identifican mediante los niveles de colorantes de fluorescencia (véase por ejemplo la patente europea N.º 0 126.450), y perlas marcadas de forma distinguible con dos colorantes diferentes, en los que las perlas se identifican midiendo por separado la intensidad de fluorescencia de cada uno de los colorantes (véase por ejemplo las patentes de Estados Unidos N.º 4.499.052 y 4.717.655).

[0035] Matrices tanto unidimensionales como bidimensionales para el análisis simultánea de múltiples analitos mediante citometría de flujo están disponibles en el mercado. Ejemplos de matrices unidimensionales de perlas teñidas individualmente distinguibles mediante el nivel de intensidad de fluorescencia incluyen la BD™ Cytometric Bead Array (CBA) (BD Biosciences, San Jose, Calif.) y microesferas Cyto-Plex™ Flow Cytometry (Duke Scientific, Palo Alto, Calif.). Un ejemplo de una matriz bidimensional de perlas distinguibles mediante una combinación de intensidad de fluorescencia (cinco niveles) y tamaño (dos tamaños) es las microesferas QuantumPlex™ (Bangs Laboratories, Fisher, Ind.). Un ejemplo de una matriz bidimensional de perlas teñidas doblemente distinguibles mediante los niveles de fluorescencia de cada uno de los dos colorantes se describe en el documento Fulton y col. (1997, *Clinical Chemistry* 43(9): 1749-1756).

[0036] Tal como se usa en el presente documento, la expresión “*que se une específicamente*” tiene su significado habitual dentro de la técnica. El hecho de si una molécula se une específicamente a otra molécula se determina generalmente mediante un ensayo de unión competitiva.

[0037] La muestra biológica puede corresponder, por ejemplo, a plasma, sangre u orina. La muestra biológica preferentemente corresponde a plasma. De la forma más preferente, la muestra biológica se obtiene de un individuo que padece o que corre el riesgo de padecer un trastorno trombotico o autoinmunitario.

[0038] Por “ligando” se entiende un ligando natural, un anticuerpo o un aptámero. El ligando preferentemente es un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente tanto en el ectodominio diseminado como en la variante de corte y empalme.

[0039] Tal como se usa en el presente documento, el término “*anticuerpo*” se refiere a anticuerpos tanto monoclonales como policlonales. El anticuerpo es preferentemente un anticuerpo monoclonal. Sin embargo, también puede corresponder a un anticuerpo policlonal.

[0040] El ligando y/o anticuerpo marcado de forma fluorescente pueden marcarse con cualquier compuesto fluorescente conocido en la técnica tal como por ejemplo FITC (FL1), PE (FL2), fluoróforos para uso en el láser azul (por ejemplo PerCP, PE-Cy7, PE-Cy5, FL3 y APC o Cy5, FL4), fluoróforos para uso en el láser rojo, violeta o uv (por ejemplo Pacific Blue, Pacific Orange). Procedimientos optimizados incluyen diferentes espectros de emisión para las perlas y los anticuerpos de detección. El anticuerpo está preferentemente marcado directamente. Sin embargo, también puede estar marcado indirectamente, especialmente cuando el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

[0041] Tal como se usa en el presente documento, la expresión “*ectodominio diseminado de una proteína transmembrana*” se refiere a una parte extracelular de una proteína transmembrana que ha sido escindida por procesamiento proteolítico. Los ejemplos de proteínas transmembrana para las que existe un ectodominio diseminado incluyen aunque no se limitan a L-selectina (Asimakopoulos y col., *Perfusion*, 2000. 15(6): p. 495-9), ICAM-1 (Becker, y col., *J Immunol*, 1991. 147(12): p. 4398-401), VCAM-1 (Garton y col., *SJ Biol Chem*, 2003. 278(39): p. 37459-64), receptor de VCAM-1 (Belgore y col., *Am J Cardiol*, 2001. 87(6): p. 805-7, A9), P-selectina (Dole y col., *Thromb Haemost*, 2007. 98(4): p. 806-12), CD40 (Contin y col. *J Biol Chem*, 2003. 278(35): p. 32801-9), CD23 (Gu y col., *Blood*, 1998. 92(3): p. 946-51), CD21 (Fremaux-Bacchi y col., *Int Immunol*, 1998. 10(10): p. 1459-66), HLA-E (Derre y col., *J Immunol*, 2006. 177(5): p. 3100-7), NgR (Ahmed y col., *Faseb J*, 2006. 20(11): p. 1939-41), Factor de crecimiento de hepatocitos (Wajih y col. *Circ Res*, 2002. 90(1): p. 46-52), IL-6R (Franchimont y col., *Arthritis Rheum*, 2005. 52(1): p. 84-93), TNFa (Fabris y col., *Clin Exp Immunol*, 1999. 117(3): p. 556-60), IL-4R (Silvestri y col., *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. 14(7): p. 717-9), IL-1R (Beck y col., *Mol Immunol*, 1994. 31(17): p. 1335-44), receptor de transferrina (Chitambar y col., *Blood*, 1991. 78(9): p. 2444-50) y la cadena gamma común de inmunoglobulinas (Meissner y col., *Blood*, 2001. 97(1): p. 183-91).

[0042] En una realización preferida desvelada en el presente documento, la proteína transmembrana es CD31.

[0043] Tal como se usa en el presente documento, el término “*CD31*” se refiere a la molécula de adhesión de plaquetas/celular endotelial también denominada antígeno CD31 o PECAM-1. La proteína puede ser de cualquier origen, preferentemente de origen de mamífero, y de la forma más preferente de origen humano. En el ser humano, el gen que codifica CD31 está ubicado en el locus 17q23. La secuencia de CD31 de tipo silvestre humano se muestra como la SEQ ID NO: 1. Sin embargo, la invención también se refiere a variantes alélicas de la misma, y a los homólogos de la misma en otras especies.

[0044] Tal como se muestra en la figura 5 y en la lista de secuencias para la SEQ ID NO: 1 (CD31 humano), la proteína CD31 comprende seis dominios extracelulares similares a inmunoglobulina (similares a Ig). Además, CD31 existe no solamente como una proteína transmembrana sino también como una variante de corte y empalme soluble que comprende los seis dominios extracelulares similares a Ig (véase Goldberger y col. 1994. J Biol Chem 269: 17183-17191).

[0045] Se ha descubierto inesperadamente que formas solubles de CD31 incluyen un ectodominio diseminado que comprende los 1º, 2º, 3º, 4º y 5º dominios extracelulares similares a Ig. Por lo tanto, el 6º dominio extracelular similar a Ig está presente en la variante de corte y empalme soluble pero ausente del ectodominio diseminado.

[0046] Por lo tanto, una forma preferida de la invención se refiere a un procedimiento para detectar un ectodominio diseminado de CD31 entre formas solubles de CD31 en una muestra biológica, en el que se usan al menos dos anticuerpos discriminantes, uno que se une específicamente a un epítipo ubicado en cualquiera de los cinco primeros dominios extracelulares similares a inmunoglobulina de CD31, y otro que se une específicamente a un epítipo ubicado en el sexto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31. El ligando de captura o señalización puede unirse, por ejemplo, específicamente a los primer y/o segundo dominios extracelulares similares a inmunoglobulina de CD31. El ligando de captura o señalización es preferentemente un anticuerpo de captura o señalización, que puede, por ejemplo, unirse específicamente a un epítipo ubicado en los primer y/o segundo dominios extracelulares similares a inmunoglobulina de CD31.

[0047] Dichos anticuerpos se conocen bien en la técnica y pueden corresponder, por ejemplo, a uno cualquiera de los anticuerpos enumerados en la base de datos HLDA Antibody Database (véase la página web 99.mh-hannover.de/aktuelles/projekte/hlda7/hldabase/CD31.htm).

[0048] Tal como se usa en el presente documento, la expresión “*epítipo ubicado en el sexto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31*” se refiere a un epítipo ubicado dentro de los aminoácidos 499 a 601 de la SEQ ID NO: 1, es decir dentro del sexto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31 (aminoácidos 499 a 591 de la SEQ ID NO: 1) y/o dentro de la región yuxtamembrana (aminoácidos 592 a 601 de la SEQ ID NO: 1). Preferentemente, dichos epítipos están ubicados dentro de los aminoácidos 499 a 591, 524 a 601 o 524 a 538 de la SEQ ID NO: 1. En una realización preferida, el anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en el sexto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31 corresponde al anticuerpo PECAM 1.2 (Invitrogen, San Diego, California), el anticuerpo PECAM1.1, o el anticuerpo HC1/6 (Serotec, Kidlington, Reino Unido). El anticuerpo PECAM 1.2 ha sido descrito, por ejemplo, en Yan y col. (Cell Adhes Commun 3: 45-66).

[0049] Tal como se usa en el presente documento, la expresión “*epítipo ubicado en cualquiera de los cinco primeros dominios extracelulares similares a inmunoglobulina de CD31*” se refiere a un epítipo ubicado dentro de los aminoácidos 28 a 493 de la SEQ ID NO: 1, de la forma más preferente dentro de los aminoácidos 34 a 493 de la SEQ ID NO: 1. En realizaciones preferidas según la invención, dicho epítipo está ubicado en el quinto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31, o en el primer y/o segundo dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31.

[0050] Tal como se usa en el presente documento, la expresión “*epítipo ubicado en el quinto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31*” se refiere a un epítipo ubicado dentro de los aminoácidos 424 a 493 de la SEQ ID NO: 1. Preferentemente, dichos epítipos están ubicados dentro de los aminoácidos 448 a 470 de la SEQ ID NO: 1. En una realización preferida, el anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en el quinto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31 corresponde al anticuerpo MEM-05 (Zymed Laboratories, South San Francisco, California).

[0051] Tal como se usa en el presente documento, la expresión “*epítipo ubicado en el primer y/o segundo dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31*” se refiere a un epítipo ubicado dentro de los aminoácidos 34 a 233 de la SEQ ID NO: 1. Un epítipo ubicado en el primer dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31 está preferentemente ubicado dentro de los aminoácidos 49 a 68 de la SEQ ID NO: 1. Un epítipo ubicado en el primer dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31 está preferentemente ubicado dentro de los aminoácidos 166 a 187 de la SEQ ID NO: 1. En una realización preferida, el anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en los dos primeros dominios extracelulares similares a inmunoglobulina de CD31 corresponde al anticuerpo WM59 (dominio 2, BD, San Jose, California), al anticuerpo JC70A (dominio 1, DAKO, Glostrup, Dinamarca) o al anticuerpo 9G11 (dominio 1, R&D systems, Minneapolis, EE. UU.). Los anticuerpos WM59 y JC70A se han descrito, por ejemplo, en Fawcett y col. (J Cell Biol 128: 1229-1241).

[0052] Dichas formas solubles de la proteína transmembrana pueden incluir formas solubles adicionales que corresponden a, por ejemplo, variantes de corte y empalme solubles adicionales, ectodominios diseminados adicionales, o a variantes generadas mediante procesamiento proteolítico. Cuando las formas solubles incluyen al menos tres formas solubles, pueden usarse más de dos anticuerpos discriminantes. Dentro de esta realización, los anticuerpos discriminantes se seleccionan de una manera tal que discriminen entre las formas solubles, y el anticuerpo de captura o señalización se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente en todas dichas formas solubles.

[0053] Datos de cinco muestras de plasma mostraron que la mayoría de la CD31 diseminada circulante comprende dominios similares a Ig 1 a 5. Sin embargo, el dominio similar a Ig 5 podría estar ausente en hasta el 16% del CD31 en plasma, lo que indica que puede existir más de un sitio de escisión en los dominios extracelulares de CD31. Por lo tanto, una prueba más precisa para diferenciar entre todas las formas solubles de CD31 incluiría también detección del dominio similar a Ig 1, además de la detección de los dominios similares a Ig 5 y 6 de CD31. Por lo tanto, el procedimiento para detectar un ectodominio diseminado de CD31 entre formas solubles de CD31 en una muestra biológica puede comprender el uso de tres anticuerpos discriminantes, que se unen específicamente a epítipos ubicados en el primer y/o segundo dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31, en el quinto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31, y en el sexto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31, respectivamente. En esta realización, el anticuerpo de captura o señalización debe unirse específicamente a un epítipo ubicado en el primer y/o segundo dominios extracelulares similares a inmunoglobulina de CD31.

[0054] El procedimiento para detectar un ectodominio diseminado de CD31 puede comprender además la etapa de calcular la proporción, el porcentaje y/o la cantidad de dichas formas solubles que corresponde a dicho ectodominio diseminado de CD31, y/o la etapa de comparar las señales medidas con las obtenidas con al menos una muestra biológica que comprende cantidades conocidas de dicho ectodominio diseminado y de dichas variantes de corte y empalme solubles. El cálculo puede realizarse, por ejemplo, tal como se describe por ejemplo en el párrafo titulado “medición sustractiva de CD31 soluble” en el ejemplo 1. El procedimiento para detectar un ectodominio diseminado de CD31 preferentemente comprende la etapa de calcular la relación de ectodominio diseminado con respecto a formas solubles totales, es decir la relación de CD31 diseminada con respecto a todas las isoformas solubles (isoforma soluble que comprende los dominios 1-6, isoforma soluble que comprende los dominios 1-5 e isoforma soluble que comprende los dominios 1-2).

[0055] La figura 4 ilustra un procedimiento según la invención para la detección y cuantificación del ectodominio diseminado de CD31. Se usan tres tipos de perlas, enlazadas a anticuerpos que se unen específicamente a epítipos ubicados en el 1º, el 5º o el 6º dominio extracelular similar a Ig respectivamente. El anticuerpo marcado de forma fluorescente se une específicamente a un epítipo ubicado en los 1º y 2º dominios extracelulares similares a Ig. Un sencillo cálculo sustractivo basado en la medición de la intensidad de la señal obtenida para cada perla permite cuantificar la proporción respectiva de cada una de las formas solubles de CD31:

50 - Isoforma soluble que comprende los dominios 1-6 = $aCD31_{d6}$

- Isoforma soluble que comprende los dominios 1-5 = $aCD31_{d5} - aCD31_{d6}$

- Isoforma soluble que comprende los dominios 1-2 = $aCD31_{d1} - (aCD31_{d5} + aCD31_{d6})$

[0056] Los procedimientos anteriores pretenden detectar ectodominios diseminados que son solubles en un fluido biológico. Sin embargo, estos procedimientos pueden estar adaptados para detectar una isoforma diseminada de una proteína transmembrana (por ejemplo $CD31^{diseminada}$) en una célula que expresa dicha proteína transmembrana. En ese caso, los anticuerpos discriminantes se unen específicamente a epítipos que están

ubicados en una región que está presente tanto en la isoforma diseminada como en la proteína transmembrana de longitud completa (por ejemplo dominio similar a Ig 6), o en una región que está presente en la isoforma diseminada o en la proteína transmembrana de longitud completa (por ejemplo dominios similares a Ig 1-2). Este aspecto de la invención se ilustra para CD31 mediante el ejemplo 2, figura 1 y figura 2a.

5 **[0057]** En una realización preferida desvelada en el presente documento, la proteína transmembrana es GPVI.

10 **[0058]** Tal como se usa en el presente documento, el término "GPVI" se refiere a la glucoproteína plaquetaria VI. La proteína puede ser de cualquier origen, preferentemente de origen de mamífero, y de la forma más preferente de origen humano. La secuencia de GPVI de tipo silvestre humana se muestra en el N.º de entrada de la SwissProt Q9HCN6. El término "GPVI" abarca la secuencia de tipo silvestre, variantes de la misma tales como variantes de corte y empalme y alélicas, y homólogos de las mismas en otras especies.

15 **[0059]** La forma cortada y empalmada de GPVI comprende la cola citoplasmática y puede detectarse, por lo tanto, usando anticuerpos específicos tales como los generados contra una proteína de unión a maltosa (MBP)-proteína de fusión de cola citoplasmática de GPVI (véase por ejemplo Suzuki-Inoue y col. J Biol Chem. 2002 277: 21561-66). Por el contrario, la forma diseminada de GPVI comprende todos los ectodominios. Los ejemplos de anticuerpos anti-ectodominios adecuados incluyen clones 11A12, 6B12, 3j24.2 y 9012.2 desvelados en el documento WO/2001/000810). El ligando natural de GPVI, convulxina se une tanto a la forma cortada y empalmada como a la forma diseminada de GPVI.

20 **[0060]** Por lo tanto, la detección de ectodominios diseminados de GPVI puede llevarse a cabo usando:
 25 - anticuerpos anti-cola y anti-ectodominio enlazados a diferentes tipos de perlas como anticuerpos discriminantes, y convulxina marcada de forma fluorescente como ligando de señalización, o
 - una perla acoplada a convulxina como ligando de captura, anticuerpos anti-cola y anti-ectodominio fluorescentes marcados de forma diferente como anticuerpos discriminantes.

30 **[0061]** También se entiende que los procedimientos anteriores pueden usarse para detectar una isoforma soluble de una proteína incluso si dicha isoforma soluble no es un ectodominio diseminado de una proteína transmembrana. Los procedimientos desvelados en el presente documento pueden usarse para detectar una forma soluble de cualquier producto que existe como al menos dos formas solubles diferentes, por ejemplo que existe como dos variantes de corte y empalme solubles. En otras palabras, permiten detectar y distinguir entre diferentes formas solubles de una proteína.

35 **[0062]** Los procedimientos desvelados en el presente documento se ilustran mediante el ejemplo específico de CD31. Sin embargo, el experto en la materia puede adaptar fácilmente este procedimiento a otra proteína de su propia elección. Dependiendo de la estructura de los dominios solubles, el experto en la materia seleccionará anticuerpos que reconocen regiones presentes en o ausentes de solamente una de las formas solubles. Además, el experto en la materia seleccionará anticuerpos de una manera tal para que permita la unión simultánea de varios anticuerpos. Dichos anticuerpos pueden seleccionarse fácilmente verificando que los anticuerpos no reconocen epítopos solapantes. Por lo tanto, una forma preferida desvelada en el presente documento, se refiere a un procedimiento en el que el anticuerpo de captura o señalización y los diferentes anticuerpos discriminantes no compiten de forma cruzada entre sí. Procedimientos para determinar si anticuerpos compiten de forma cruzada entre sí se conocen bien en la técnica e incluyen por ejemplo el procedimiento descrito por Blanchard y col. (1997, International immunology, 9(12): 1775-1784).

40 **[0063]** En una realización específica, procedimientos que comprenden la etapa de fragmentar (por ejemplo mediante digestión enzimática) las proteínas que están presentes en la muestra biológica están excluidos del alcance de la presente invención.

45 **[0064]** Los procedimientos anteriores para detectar ectodominios diseminados y/o isoformas diseminadas de una proteína transmembrana son útiles en aplicaciones tanto analíticas como de diagnóstico. Algunas de las aplicaciones de diagnóstico se describen con más detalle en el párrafo a continuación.

Procedimientos de diagnóstico y monitorización de fármacos

[0065] Se ha descubierto que un elevado riesgo de aterotrombosis está vinculado a la presencia de CD31 diseminada en la circulación, y no a la cantidad del CD31 soluble circulante total.

[0066] La solicitud desvela, por lo tanto, un procedimiento para diagnosticar si un individuo padece, o corre el riesgo de padecer, un trastorno trombótico o autoinmunitario, que comprende la etapa de detectar un ectodominio diseminado de CD31 en una muestra biológica de dicho individuo, en el que la presencia de dicho ectodominio diseminado de CD31 indica que dicho individuo padece o corre el riesgo de padecer dicho trastorno trombótico o autoinmunitario. Donde el ectodominio diseminado de CD31 es detectable, el procedimiento puede comprender además la etapa de calcular la relación de ectodominio diseminado con respecto a formas solubles totales. De hecho, se ha descubierto que esta relación tiene un muy buen valor predictivo (véase el ejemplo 7).

[0067] Basándose en este diagnóstico, puede diseñarse un régimen de tratamiento apropiado para dicho individuo. Preferentemente, dicho ectodominio diseminado de CD31 comprende los 1º, 2º, 3º, 4º y 5º dominios extracelulares similares a Ig pero carece del 6º dominio extracelular similar a Ig.

[0068] Tal como se usa en toda la presente memoria descriptiva, la expresión “*trastorno trombótico*” incluye aunque no se limita a aterotrombosis, aterosclerosis, síndrome coronario agudo, accidente cerebrovascular isquémico, arteriopatía periférica y aneurisma aórtico abdominal. Preferentemente, el trastorno trombótico es aterotrombosis.

[0069] Tal como se usa en toda la presente memoria descriptiva, la expresión “*trastorno autoinmunitario*” incluye aunque no se limita a artritis reumatoide (RA), espondiloartritis, esclerosis múltiple (MS), enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad de Graves y diabetes mellitus.

[0070] La detección de dicho ectodominio diseminado de CD31 puede realizarse según cualquier procedimiento conocido en la técnica. Puede detectarse por ejemplo mediante uno de los procedimientos descritos en el párrafo anterior. Como alternativa, la detección puede realizarse mediante un ensayo ELISA. Sin embargo, se prefiere detectar el ectodominio de CD31 diseminada según un procedimiento tal como se desvela en el presente documento, dado que dichos procedimientos son más fáciles de configurar, más rápidos y más sensibles.

[0071] La muestra biológica puede corresponder, por ejemplo, a plasma, sangre u orina. La muestra biológica preferentemente corresponde a plasma.

[0072] El procedimiento de diagnóstico desvelado en el presente documento puede repetirse al menos en dos puntos en el tiempo diferentes para monitorizar la progresión de un trastorno trombótico o autoinmunitario en el individuo y/o para valorar la gravedad de dichos trastornos en dicho individuo, y/o para monitorizar la respuesta del individuo a un fármaco.

[0073] Tal como se usa en el presente documento, acontecimientos que se producen en “un punto en el tiempo diferente (o posterior)” se refieren a acontecimientos que se producen en un intervalo de al menos 1 hora. Preferentemente, los acontecimientos se producen en un intervalo de al menos 6 horas, 12 horas, 1 día, una semana, dos semanas o un mes.

[0074] La solicitud también desvela el uso de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en el sexto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31 para diagnosticar si un individuo padece, o corre el riesgo de padecer, un trastorno trombótico o autoinmunitario.

[0075] La solicitud desvela además un procedimiento para diagnosticar si un individuo padece, o corre el riesgo de padecer, aterotrombosis, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una muestra biológica de dicho individuo;
- b) detectar el ectodominio diseminado de CD31, por ejemplo según cualquiera de los procedimientos descritos en el párrafo anterior titulado “detección de ectodominios diseminados”, en dicha muestra biológica; y
- c) correlacionar el resultado de la etapa (a) con un riesgo de padecer aterotrombosis;

en el que la presencia de dicho ectodominio diseminado de CD31 en dicha muestra biológica indica que dicho individuo padece o corre el riesgo de padecer aterotrombosis. Preferentemente, dicho ectodominio diseminado de CD31 comprende los 1º, 2º, 3º, 4º y 5º dominios extracelulares similares a Ig pero carece del 6º dominio extracelular similar a Ig.

5 **[0076]** La presencia de al menos el 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95% de ectodominio diseminado en las formas solubles de CD31 indica que dicho individuo padece o corre el riesgo de padecer un trastorno trombótico o autoinmunitario, tal como por ejemplo aterotrombosis.

10 **[0077]** En una realización preferida, la cantidad y/o el porcentaje de CD31 diseminada en una muestra biológica de dicho individuo a diagnosticar se compara con la cantidad y/o el porcentaje de CD31 diseminada en una muestra biológica de un individuo sano.

15 **[0078]** Niveles elevados de variantes de corte y empalme solubles de CD31 asociados con niveles bajos de CD31 diseminada indican que el individuo a diagnosticar padece dolor torácico inespecífico, eventualmente asociado con placas de ateroma. Un ligero incremento de los niveles de CD31 diseminada asociado con niveles normales o reducidos de variantes de corte y empalme solubles de CD31 indica que el individuo a diagnosticar padece aterosclerosis. Un incremento importante de los niveles de CD31 diseminada asociado con cantidades indetectables de Variantes de corte y empalme solubles de CD31 indica que el individuo a diagnosticar padece aterotrombosis.

20 **[0079]** Los procedimientos de diagnóstico desvelados en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, para determinar si un individuo padece un trastorno trombótico o autoinmunitario, para valorar la gravedad de un trastorno trombótico o autoinmunitario en un individuo, para pronosticar el riesgo de acontecimientos cardiovasculares mayores, tales como recurrencia de un infarto de miocardio, para diseñar un régimen de tratamiento, para monitorizar la progresión de un trastorno trombótico o autoinmunitario en un paciente, para predecir y para monitorizar la respuesta de un paciente a un fármaco y/o para ajustar el tratamiento de un paciente.

25 **[0080]** Cuando el procedimiento de diagnóstico desvelado en el presente documento se usa para monitorizar la progresión de un trastorno, para valorar la gravedad de un trastorno, para monitorizar la respuesta a un fármaco y/o para ajustar el tratamiento de un paciente, se lleva a cabo en muestras biológicas tomadas de un paciente dado en diferentes puntos en el tiempo. Las muestras biológicas pueden tomarse, por ejemplo, cada mes para seguir la respuesta del paciente a un tratamiento. Basándose en estos análisis, el tratamiento puede ajustarse a continuación. Puede decidirse, por ejemplo, cambiar el fármaco, o ajustar la dosis del fármaco para mejorar su eficacia y/o minimizar los efectos secundarios. Dicha monitorización del fármaco es especialmente aconsejable en tratamientos a largo plazo, por ejemplo cuando se administra un compuesto inmunodepresor a un paciente. Detectar CD31 diseminada puede usarse para monitorizar la respuesta inflamatoria en el paciente y, por lo tanto, para determinar la dosis eficaz mínima de fármaco que puede administrarse al paciente.

30 **[0081]** La solicitud desvela, por lo tanto, un procedimiento para monitorizar la progresión de un trastorno trombótico o autoinmunitario, y/o para valorar la gravedad de un trastorno trombótico o autoinmunitario en un individuo, y/o para monitorizar la respuesta de un paciente a un fármaco que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una primera muestra biológica de dicho paciente;
- 45 b) detectar ectodominios diseminados de CD31 en dicha primera muestra biológica;
- c) proporcionar al menos una segunda muestra biológica de dicho paciente, en la que al menos una segunda muestra biológica ha sido tomada de dicho paciente en un punto en el tiempo posterior a la primera muestra biológica;
- 50 d) detectar ectodominios diseminados de CD31 en dicha al menos una segunda muestra biológica;
- e) comparar los resultados obtenidos en las etapas (b) y (d).

55 **[0082]** Varias muestras biológicas diferentes, tomadas del mismo paciente en diferentes puntos en el tiempo, pueden usarse en las etapas (c), (d) y (e). Por ejemplo, en el marco de un tratamiento a largo plazo del paciente, pueden tomarse muestras biológicas del paciente a intervalos regulares (por ejemplo cada mes, cada dos meses o dos veces al año).

[0083] Dicho procedimiento para monitorizar la progresión de un trastorno trombótico o autoinmunitario; y/o para valorar la gravedad de dicho trastorno; y/o para monitorizar la respuesta de un paciente a un fármaco puede comprender además una etapa (f) de diseñar un régimen de tratamiento para dicho paciente basándose en los resultados de la etapa (e).

[0084] En el marco de la monitorización de fármacos, la muestra biológica de la etapa (a) se toma preferentemente antes del inicio del tratamiento del paciente, y la muestra biológica de la etapa (c) después del inicio del tratamiento. Una disminución de los niveles de CD31 diseminada medidos en la etapa (d) en comparación con los niveles de CD31 diseminada medidos en la etapa (b) indica que el fármaco es eficaz para tratar a dicho paciente.

[0085] Más específicamente, la solicitud desvela un procedimiento para monitorizar la respuesta de un paciente que padece un trastorno trombótico o autoinmunitario a un fármaco, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a) detectar ectodominios diseminados de CD31 en una muestra biológica de dicho paciente antes y después del inicio de un tratamiento de dicho paciente con dicho fármaco;

b) comparar los niveles de ectodominios diseminados de CD31 detectados en la etapa (a); y, opcionalmente,

c) correlacionar una diferencia en dichos niveles de ectodominios diseminados de CD31 con la eficacia del fármaco para tratar a dicho paciente.

[0086] Una disminución de los niveles de ectodominios diseminados de CD31 después del inicio del tratamiento en comparación con los niveles de ectodominios diseminados de CD31 antes del inicio del tratamiento indica que el paciente responde a dicho fármaco, y que el fármaco es eficaz para tratar a dicho paciente. Preferentemente, la disminución es de al menos el 5, 10, 25, 50, 75 o 90%. A la inversa, si no se descubre ninguna diferencia significativa en los niveles de ectodominios diseminados de CD31 en la etapa (b), o si se descubre un incremento de los niveles de ectodominios diseminados de CD31 después del inicio del tratamiento en la etapa (b), el paciente no responde a dicho fármaco y el fármaco no es eficaz para tratar a dicho paciente.

[0087] La solicitud desvela además el uso de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en el sexto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31 para monitorizar la progresión de un trastorno trombótico o autoinmunitario en un paciente, y/o para monitorizar la respuesta de un paciente a un fármaco.

Kits de diagnóstico

[0088] La solicitud también desvela un kit de diagnóstico que comprende:

a) un anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente tanto en dicho ectodominio diseminado como en dicha variante de corte y empalme soluble.

b) un primer tipo de perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente en dicho ectodominio diseminado y ausente de dicha variante de corte y empalme soluble, o presente en dicha variante de corte y empalme soluble y ausente de dicho ectodominio diseminado; y

c) un segundo tipo de perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente tanto en un ectodominio diseminado de una proteína transmembrana como en una variante de corte y empalme soluble de dicha proteína transmembrana.

[0089] Dichos kits pueden usarse, por ejemplo, en los procedimientos de diagnóstico desvelados en el presente documento, y/o en la selección del fármaco, y/o en la monitorización del fármaco.

[0090] En una realización preferida desvelada en el presente documento, la proteína transmembrana es CD31. El anticuerpo marcado de forma fluorescente y el anticuerpo enlazado al primer tipo de perla preferentemente se unen específicamente a un epítipo ubicado en cualquiera de los cinco primeros dominios extracelulares similares a inmunoglobulina de CD31. El anticuerpo enlazado al segundo tipo de perla preferentemente se une específicamente a un epítipo ubicado en el 6º dominio similar a Ig.

[0091] Dicho kit de diagnóstico puede comprender, por ejemplo:

- un anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a un epítipo ubicado en el primer y/o segundo dominios extracelulares similares a inmunoglobulina de CD31 (por ejemplo un anticuerpo WM59 marcado, un anticuerpo 9G11 marcado, o un anticuerpo JC70A marcado, DAKO.);

5 - un primer tipo de perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en el sexto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31 (por ejemplo el anticuerpo PECAM 1.2);

- uno o ambos de:

10 i) un segundo tipo de perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en el quinto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31 (por ejemplo el anticuerpo MEM-05, PECAM 1.1 o HC1/6); y

ii) un tercer tipo de perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en el primer y/o segundo dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31 (por ejemplo anticuerpo JC70A, 9G11 o WM59).

15 **[0092]** En una realización específica, el kit comprende un primer tipo de perla enlazada al anticuerpo PECAM 1.2., un segundo tipo de perla enlazada al anticuerpo MEM-05, un anticuerpo WM-59 marcado de forma fluorescente (por ejemplo PE-WM-59), y opcionalmente un tercer tipo de perla enlazada al anticuerpo JC70A.

20 **[0093]** Otros kits de diagnóstico desvelados en el presente documento comprenden:

a) una perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente tanto en un ectodominio diseminado de una proteína transmembrana como en una variante de corte y empalme soluble de dicha proteína transmembrana;

25 b) un primer tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente en dicho ectodominio diseminado y ausente de dicha variante de corte y empalme soluble, o presente en dicha variante de corte y empalme soluble y ausente de dicho ectodominio diseminado; y

30 c) un segundo tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente tanto en dicho ectodominio diseminado como en dicha variante de corte y empalme soluble, en el que la marca de dicho anticuerpo marcado de forma fluorescente es diferente de la marca de dicho primer anticuerpo marcado de forma fluorescente; y, opcionalmente

35 d) un tercer tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente tanto en dicho ectodominio diseminado como en dicha variante de corte y empalme soluble, en el que la marca de dicho tercer anticuerpo marcado de forma fluorescente es diferente de la marca de dichos primer y segundo anticuerpos marcados de forma fluorescente.

40 **[0094]** En una realización preferida desvelada en el presente documento, la proteína transmembrana es CD31. El segundo anticuerpo marcado de forma fluorescente y el anticuerpo enlazado a la perla preferentemente se unen específicamente a un epítipo ubicado en cualquiera de los cinco primeros dominios extracelulares similares a inmunoglobulina de CD31. El primer anticuerpo marcado de forma fluorescente preferentemente se une específicamente a un epítipo ubicado en el 6º dominio similar a Ig.

45 **[0095]** Otra realización preferida se refiere a un kit que comprende:

- una perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en el 1º dominio extracelular similar a Ig (por ejemplo un anticuerpo Pecam1.3, 9G11 o JC70A);

50 - un primer tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a un epítipo ubicado en el 6º dominio extracelular similar a Ig (por ejemplo un anticuerpo PECAM 1.2 marcado tal como FITC-PECAM 1.2);

- uno o ambos de:

55 - un segundo tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a un epítipo ubicado en el 1º o 2º dominio extracelular similar a Ig (por ejemplo un anticuerpo WM59 o L133 marcado tal como PE-WM59 o PE-L133); y

- un tercer anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a un epítipo ubicado en el 5º dominio extracelular similar a Ig (por ejemplo el anticuerpo MEM-05 o PECAM 1.1 o HC1/6);

5 **[0096]** Un anticuerpo marcado de forma fluorescente puede incluir fluoróforos excitados por un láser azul y que emiten en los canales de FITC, PE, PerCP o PE-tándem, o excitados por un láser rojo y que emiten en los canales de Cy5/APC o APC-tándem, o por un láser violeta y que emiten en los canales de Pacific Blue o Pacific Orange o por un láser UV y que emiten en los canales de Quantum Dot);

10 **[0097]** Estos kits pueden comprender adicionalmente otros componentes, tales como por ejemplo reactivos y/o instrucciones.

15 **[0098]** Los kits también pueden comprender muestras que comprenden una cantidad conocida de ectodominio diseminado de CD31 y/o de variantes de corte y empalme solubles, muestras de individuos sanos y/o muestras de individuos que padecen aterosclerosis o aterotrombosis.

Procedimientos para analizar rutas de señalización

20 **[0099]** Los procedimientos anteriores de detección de ectodominios diseminados pueden adaptarse para otros fines tales como el análisis de interacción proteína/proteína y de ruta de señalización. Este procedimiento es más fácil, más rápido y más potente que co-IP/WB, más específico que CASE/Phosphlow y CBA Flex set, y realmente combina las ventajas de estas técnicas.

25 **[0100]** La solicitud desvela, por lo tanto, un procedimiento para determinar si una molécula candidata es miembro de un complejo molecular que comprende las etapas de:

a) proporcionar una perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un miembro de dicho complejo molecular;

30 b) poner en contacto dicha perla con una muestra biológica que contiene dicho complejo molecular;

c) poner en contacto dichas perlas que se pusieron en contacto con la muestra biológica con al menos un tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a dicha molécula candidata; y

35 d) detectar la fluorescencia mediante citometría de flujo;

en el que:

40 - la detección de una señal en la etapa (d) indica que dicha molécula candidata es un miembro de dicho complejo molecular; y

- si se usa más de un tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente en la etapa (c), dichos anticuerpos están marcados con marcas fluorescentes diferentes.

45 **[0101]** El procedimiento desvelado en el presente documento permite realizar varias determinaciones simultáneamente, usando la misma muestra biológica. Por lo tanto, el procedimiento anterior puede llevarse a cabo para al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 10 moléculas candidatas simultáneamente. En dicho caso, la etapa (c) comprende poner en contacto dichas perlas que se pusieron en contacto con la muestra biológica con anticuerpos marcados de forma fluorescente que se unen específicamente a cada una de dichas al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 10 moléculas candidatas. Cada uno de estos anticuerpos marcados de forma fluorescente está marcado con una marca fluorescente que es diferente de las otras marcas fluorescentes.

55 **[0102]** La muestra biológica corresponde preferentemente a moléculas solubles o solubilizadas, preferentemente derivadas de una célula. La muestra biológica puede corresponder, por ejemplo, a un lisado celular. Un protocolo para preparar dicho lisado celular se describe, por ejemplo, en el ejemplo 5. Las células pueden lisarse, por ejemplo, en hielo durante 30 minutos con un tampón RIPA que contiene un cóctel de inhibidores de proteasa y fosfatasa. Como alternativa, pueden prepararse moléculas solubles o solubilizadas por ejemplo congelando, descongelando y triturando células.

[0103] El procedimiento anterior permite reunir múltiple información relacionada con un complejo molecular

dado y/o una ruta de señalización dada. Tal como se usa en el presente documento, un “*complejo molecular*” se refiere a un complejo de moléculas asociadas. Las moléculas pueden corresponder, por ejemplo, a proteínas, lípidos, azúcares o nucleótidos. En una realización preferida desvelada en el presente documento, el complejo molecular es un complejo de proteínas y los miembros de dicho complejo de proteínas son proteínas.

5 **[0104]** El procedimiento desvelado en el presente documento permite, por ejemplo, determinar las proteínas que están asociadas con una proteína dada en condiciones específicas, o determinar si una proteína dada está fosforilada o no (usando un anticuerpo marcado de forma fluorescente que reconoce específicamente la isoforma fosforilada de la proteína). La molécula candidata puede corresponder, por lo tanto, por ejemplo a una proteína que está asociada con el miembro capturado por una perla del complejo molecular solamente en ciertas condiciones, una proteína que está fosforilada solamente en ciertas condiciones, o una proteína de la cual no se sabe si es un miembro de dicho complejo molecular. El procedimiento desvelado en el presente documento también permite analizar un complejo de glucoproteínas y de proteoglicanos de la matriz extracelular, o un complejo de azúcares, lípidos y proteínas implicadas en la formación de un trombo.

15 **[0105]** Los anticuerpos usados en la etapa (c) pueden unirse específicamente a todas las isoformas de una proteína que es probable que sea miembro de dicho complejo molecular, o solamente a una isoforma diseminada, cortada y empalmada o fosforilada de dicha proteína.

20 **[0106]** Como alternativa, los anticuerpos usados en la etapa (c) pueden unirse a aminoácidos fosforilados tales como fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina independientemente de la secuencia primaria de la proteína.

25 **[0107]** Los anticuerpos usados en la etapa (c) también pueden unirse específicamente a nucleótidos (secuencias de ADN o ARN, nucleótidos cíclicos tales como AMPc o GMPc), azúcares (por ejemplo ácido siálico), lípidos implicados en rutas de señalización (por ejemplo hormonas esteroideas, inositol, fosfatidilinositol, leucotrienos, prostaglandinas, tomboxano, gangliósidos, caveolina, ceramidas, etc.), lipopolisacáridos implicados en señalización mediada por TLR, y glucolípidos (por ejemplo galactocerebrósido, que está implicado en señalización de oligodendrocitos).

30 **[0108]** El complejo molecular puede incluir, por ejemplo, receptores de membrana, ligandos extracelulares y proteínas intracelulares tales como proteínas de transducción. De la forma más preferente, la molécula candidata es una molécula intracelular, por ejemplo una proteína intracelular.

35 **[0109]** Los ejemplos de complejos moleculares que pueden analizarse usando este procedimiento incluyen los que se dan en la tabla a continuación. La proteína capturada con el anticuerpo enlazado a perlas puede ser uno cualquiera de los miembros del complejo molecular.

Ruta de señalización	Proteínas asociadas a la membrana	Fosfoproteínas	Proteínas intracelulares asociadas (activador)	Proteínas intracelulares asociadas (inhibidor)
Señalización de CD3 (célula T)	CD31, CD3, CD45, CD28, CTLA4, SLAM, CD31	p56LcK, fosfoITAM de TCR (CD3ζ)	Zap70, NFkB, ERK, IκBK, RhoA...	CsK, PTPasa
Señalización de IgM (célula B)	IgM, CD19, CD22	Iga/b ITAM, SYK, GRB2, BTK, PI3K	RAS, IKK, PKCb, RAC	SHP1, SHIP, PTEN, <i>cleaved Notch</i>
IL-6R (señalización de citoquina)	IL-6R, Gp130	Receptor de IL-6 (4 tirosinas)	Jak1, Stat3, Gab, ERK, MAPK	SHP2, SOCS3
Señalización de b-integrina (investigación sobre cáncer)	Be-integrina, Talina, Paxillina, Fyn, FAK	FAK	a-actinina, GRb2, Ras, Raf1, MEK1/2, ERK1/2...	Sos, PTPasa
Señalización de C83 (después de la diseminación) (investigación sobre Alzheimer)	C83 (después de la diseminación), b-secretasa, a-secretasa, C99 (no eliminada por b-secretasa) APP (en	GSK3	Cdk5/p25, Cdk5/p35	

	la molécula completa)			
Señalización de FasL (Apoptosis)	FasL, FADD, TRADD, TNF-R1, RIP, <i>Reaper</i> , Caspasas, FLIP		p53, Bax, BCL-2, Apaf-1, MDM2, c-Myc	

[0110] En una realización preferida desvelada en el presente documento, el miembro de dicho complejo molecular capturado con el anticuerpo enlazado a perlas es CD31.

5 **[0111]** El anticuerpo marcado de forma fluorescente puede corresponder, por ejemplo, a un anticuerpo que se une específicamente a una proteína CD31 que comprende una tirosina fosforilada en la posición 686. Como alternativa, el anticuerpo marcado de forma fluorescente puede corresponder, por ejemplo, a un anticuerpo que se une específicamente a una isoforma fosforilada de una proteína intracelular que es parte de la ruta de señalización de CD31, o a un proteína de transducción que es parte de la ruta de señalización de CD31. Dichas proteínas se describen, por ejemplo, en el documento Newman y Newman (2003 *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 953-964) y/o en el documento Newton-Nash y Newman (1999. *J Immunol* 163: 682-688). Dichos anticuerpos pueden unirse, por ejemplo, a una proteína CD31 que comprende el sexto dominio extracelular similar a inmunoglobulina (por ejemplo PECAM 1.2), una proteína CD31 que comprende el segundo dominio extracelular similar a inmunoglobulina (por ejemplo WM59), CD3, CD28, SHP2, CD45, CTLA4, SLAM, p56LcK, CD3 ζ , Zap70, NFkB, ERK, IkbK, RhoA, Csk y PTPasa.

[0112] La solicitud desvela además un kit para analizar un complejo molecular que comprende:

- 20 i) una perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un miembro de dicho complejo molecular; y
 ii) al menos un tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a otro miembro de dicho complejo molecular.

25 en el que, si el kit comprende más de un tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente, dichos anticuerpos están marcados con marcas fluorescentes diferentes.

[0113] Más específicamente, la solicitud desvela además un kit que comprende:

30 - un anticuerpo enlazado a perlas que se une específicamente a un epítipo ubicado en el sexto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31 (por ejemplo PECAM 1.2); y

35 - al menos un anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a una proteína seleccionada entre el grupo constituido por una proteína CD31 que comprende una tirosina fosforilada en la posición 686 (por ejemplo un anticuerpo policlonal de conejo marcado anti-CD31 fosfo-tirosina 686, que puede estar marcado por ejemplo con fragmentos (Fab')₂ conjugados a AlexiaFluor@488); una proteína CD31 que comprende el sexto dominio extracelular similar a inmunoglobulina (por ejemplo PECAM 1.2), una proteína CD31 que comprende el segundo dominio extracelular similar a inmunoglobulina (por ejemplo WM59), CD3, CD28, SHP2, CD45, CTLA4, SLAM, p56LcK, CD3 ζ , Zap70, NFkB, ERK, IkbK, RhoA, Csk y PTPasa.

40 **[0114]** La solicitud también desvela kits para analizar otros complejos moleculares. Dichos kits pueden comprender, por ejemplo, un anticuerpo enlazado a perlas y al menos un anticuerpo marcado de forma fluorescente, en el que cada anticuerpo se une específicamente a una proteína seleccionada entre el grupo constituido por:

45 - IgM, CD19, CD22, Iga/b ITAM, SYK, GRB2, BTK, PI3K, RAS, IKK, PKCb, RAC, SHP1, SHIP, PTEN y *cleaved Notch*;

- IL-6R, Gp130, Jak1, Stat3, Gab, ERK, MAPK, SHP2, SOCS3;

50 - Beta-integrina, Talina, Paxillina, Fyn, FAK, a-actinina, GRb2, Ras, Raf1, MEK1/2, ERK1/2, Sos y PTPasa;

- C83 (después de la diseminación), b-secretasa, a-secretasa, C99 (no eliminada por la b-secretasa) APP (en la molécula completa), GSK3, Cdk5/p25, Cdk5/p35; o

- FasL, FADD, TRADD, TNF-R1, RIP, *Reaper*, Caspasas, FLIP, p53, Bax, BCL-2, Apaf-1, MDM2, c-Myc.

[0115] Los kits desvelados en el presente documento pueden comprender además un anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a fosfotirosinas o a fosfoserina/treoninas.

[0116] Los diferentes anticuerpos usados en los procedimientos y kits para analizar un complejo molecular preferentemente no compiten de forma cruzada entre sí.

[0117] Aunque teniendo distintos significados, los términos “que comprende”, “que tiene”, “que contiene” y “que consiste en” se han usado de forma intercambiable en toda esta memoria descriptiva y pueden sustituirse entre sí.

[0118] La invención será evaluada adicionalmente en vista de los siguientes ejemplos y figuras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0119]

La figura 1 muestra un ejemplo representativo de análisis por citometría de flujo de 10 colores de células de sangre humana periférica de un donante sano. Controles de isotipo de anticuerpos anti-dom1 de CD31 y anti-dom6 de CD31 se muestran en los recuadros. Linfocitos, Monocitos y Granulocitos se seleccionaron (“gated”) dentro del dispersor FSC/SSC. Linfocitos B (CD20 A700+) y T (CD3 PE-TR+) se identificaron y se seleccionaron de entre los “Linfocitos” y subpoblaciones CD8+ (PerCP) y CD4+ (APC) se seleccionaron de entre linfocitos T. Células T CD8+ y CD4+ se analizaron adicionalmente para la expresión de HLA-DR y CD45RA y se subdividieron consecuentemente en células activadas (1), con memoria (2) y sin exposición previa (3). Todos los leucocitos fueron positivos para dom6 de CD31. La falta de dom1 se incrementaba de células T sin exposición previa (3) a con memoria (2) a activadas (1).

La figura 2 muestra que la aparente pérdida de CD31 en linfocitos se debe a su diseminación extracelular. **a.** Moléculas CD31 unidas a membrana celular solubilizada se extrajeron de células T CD4+ Jurkat cultivadas y se acoplaron a perlas fluorescentes. El porcentaje de moléculas unidas a perlas dom1- es <6% en condiciones de reposo y >99% 5' después de ensamblaje en TCR. **b.** La CD31 más soluble en sobrenadante de cultivo () de células T activadas por TCP y en plasma humano () consiste en un único fragmento truncado que comprende dom1-dom5 y carece de dom6. Niveles despreciables de CD31 truncada que carecía tanto de dom5 como de dom6 podían detectarse solamente en el plasma.

La figura 3 muestra que un péptido homotípico del fragmento extracelular residual en CD31^{diseminada}T induce fosforilación del ITIM de CD31. **a.** Respuesta proliferativa a acoplamiento en TCR de células mononucleares de sangre periférica humana en presencia de dosis crecientes de péptido 551-574 de CD31. *p<0,05 frente a dosis “0”. **b.** valoración por citometría de flujo de la fosforilación de 686ITIM en CD31 unida a membrana solubilizada de células T Jurkat CD4+. Las proteínas solubilizadas se capturaron mediante perlas de CBA funcionales para E9-PECAM-1.2 (dom6) y la detección se llevó a cabo mediante sueros de conejo anti-pY686 seguidos por anticuerpo secundario anti-conejo marcado con AlexaFluor@488. El histograma muestra la Mediana de la intensidad Fluorescente (MFI) ± el % del coeficiente de variabilidad (CV%) de Alexafluor@488 (pY686) respecto a perlas adquiridas con 2000 E9-PECAM-1.2. Pervan= control positivo (pervanadato); CD3/CD28= anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (1 µg/ml cada uno); péptido = péptido 551-574 de CD31 (100 µM).

Las figuras 4 y 5 ilustran el principio del procedimiento según la invención. En la figura 5, el cuadro negro representa un anticuerpo discriminante. El cuadro blanco representa un anticuerpo de captura o de señalización.

La figura 6A muestra que CD31 diseminada puede usarse como un marcador de diagnóstico y/o pronóstico para enfermedades inflamatorias. Los cuadros blancos son indicativos de un mal pronóstico del paciente, y los cuadros negros son indicativos de un buen pronóstico del paciente. “VS” significa la velocidad de sedimentación de los eritrocitos. “CRP” significa la proteína C-reactiva. “sCD31 Total” significa el nivel total de formas solubles de CD31, medidas con el procedimiento de la invención. “sCD31^{diseminada}” significa el ectodominio diseminado de CD31, medido con el procedimiento de la invención.

La figura 6B muestra que los procedimientos desvelados en el presente documento pueden usarse para medir ectodominios diseminados de GPVI.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS**[0120]**

5 La SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia de CD31 humano.

Las SEQ ID NO: 2 y 3 corresponden a péptidos CD31.

10 La SEQ ID NO: 4 corresponda a un péptido desordenado usado como control negativo.

EJEMPLOS**Ejemplo 1: material y procedimientos**

15 **[0121]** Valoración de leucocitos sanguíneos CD31⁺ y CD31^{diseminada}. Se realizó citometría de flujo de diez colores en leucocitos de sangre periférica de 5 individuos sanos en condiciones basales o después de estimulación durante una noche con 1 µg/ml solubles de anticuerpo anti-CD3 purificado (R&D Systems). Se realizó citometría de flujo de diez colores después de lisis hipotónica de eritrocitos (10 minutos a 37°C 1:10 v:v en Tris 10 mM, NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM, pH 7,4) en leucocitos de sangre periférica heparinizada de 5 individuos sanos, fijados en
20 PBS/Formaldehído al 1%/FCS al 1% durante 4 minutos a 37°C antes del procesamiento. Todos los experimentos en sangre humana fueron aprobados por el Comité Ético Internacional (véase la página web clinicaltrials.gov; Identificador: NCT00430820). Las células sedimentadas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz con un cóctel de anticuerpos monoclonales fluorescentes dirigidos a CD3 (PE-Texas Red), CD4 (PE-Cy7), CD8 (PerCP), HLA-DR (APC-Cy7), CD45RA (Pacific Blue) y CD31 (WM59, PE) de BD Biosciences y anti-
25 CD20 (AlexaFluor[®]700) y anti-CD31 (PECAM 1.2, FITC) de Invitrogen (1 µl de cada uno). Al menos 50.000 acontecimientos se adquirieron en la ventana de selección de linfocitos usando un BD LSRII[®] equipado con 3 láseres (405, 488 y 633 nm) y se analizaron con el software BD DIVA[®] 6.0.

30 **[0122]** Medición sustractiva de CD31 soluble. Para detectar la variante de corte y empalme y CD31 truncada en plasma y el sobrenadante de cultivo, una matriz de perlas de citoquina (CBA[®], BD) se fabricó a medida. Tres perlas CBA funcionalmente diferentes (A9, D5 y E9) se acoplaron a uno cualquiera de los siguientes anticuerpos monoclonales anti-CD31 purificados JC70A (dominio 1, DAKO), MEM-05 (dominio 5, Zymed) y PECAM 1.2 (dominio 6, Invitrogen). Las perlas acopladas se incubaron a continuación con el plasma de los mismos 5 controles sanos o el sobrenadante de cultivo y la unión positiva de CD31 circulante se detectó mediante un cuarto anticuerpo monoclonal
35 anti-CD31, WM-59 (dominio 1-2) acoplado a PE (BD). La concentración de CD31 en plasma que incluye al menos el dominio 1 (JC70A), o los dominios 1 a 5 (MEM-05) o todos los dominios extracelulares 1 a 6 de CD31 (PECAM 1.2) se determinó analizando la mediana de la intensidad de fluorescencia del anticuerpo de detección en ≥1000 perlas seleccionadas en muestras y diluciones sucesivas del mismo patrón (CD31 extracelular de longitud completa, recombinante, R&D Systems). Se obtuvo la curva patrón para cada una de las perlas usando las mismas concentraciones conocidas del CD31 recombinante para superar cualquier sesgo debido a diferencias en la afinidad de unión de los diversos anticuerpos. La concentración en ng/ml de CD31 determinada con perlas acopladas a PECAM 1.2 (dom 1-6) se sustrajo de la obtenida usando perlas acopladas a MEM-05 para obtener la cantidad de CD31 circulante que carece del dom6 (dom 1-5). Ésta última se sustrajo de la concentración de CD31 obtenida usando las perlas acopladas a JC70A para calcular el valor de CD31 soluble que carece tanto del dom 5 como del 6
40 pero que contiene al menos los dominios 1 y 2 (dom 1-2).

45 **[0123]** Valoración de la fosforilación de CD31-ITIM. Células Jurkat en fase logarítmica (10⁷ células/condición) se dejaron sin estimular (control negativo) o se incubaron con pervanadato (control positivo) o se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (R&D Systems, 1 µg/ml cada uno) en presencia o ausencia de péptido 551-574 (100 µM), o se incubaron con el péptido en solitario durante 20 minutos. Las células se lisaron a continuación con 1 ml de tampón RIPA sobre hielo durante 30 minutos, se ultracentrifugaron y 16 µl del sobrenadante se incubaron con perlas E9 CBA[®] funcionales revestidas con PECAM 1.2 (BD) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las perlas se lavaron posteriormente con tampón de lavado CBA y se incubaron con 2 µl de sueros de conejo anti-CD31 fosfotirosina 686 (pY686) sin diluir, seguidos por dos lavados y se incubaron con fragmentos (Fab')₂ conjugados a AlexaFluor[®]488 (1:100 en tampón de lavado CBA) o IgG de cabra anti-conejo (Invitrogen). Las perlas (2000/condición) se analizaron finalmente mediante citometría de flujo en el canal FITC (530/30 nm) y los datos se expresan como la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) ± el porcentaje del coeficiente de variabilidad (% CV) calculado con el software DIVA 6.0[®] (BD). Alícuotas de lisado por duplicado y diluciones sucesivas de CD31 recombinante se incubaron con las perlas revestidas de PECAM 1.2 y la cantidad de CD31 unida a células dom1+

se reveló usando anticuerpos WM59-R-PE (dom1) y PECAM 1.2-FITC (dom6) anti-CD31.

[0124] Unión de péptidos fluorescentes. Para la visualización de la unión de péptidos a células T CD31⁺ y CD31^{diseminada} CD4⁺, leucocitos de sangre periférica recién purificados preparados como anteriormente se lavaron con una solución tamponada que contenía EDTA 2 mM (para evitar endocitosis del péptido) y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente en una cámara humidificada a oscuras con 50 µM de péptido 551-574 de CD31 marcado con FITC y dilución 1:10 de anticuerpos monoclonales fluorescentes anti-CD31 (PE) y anti-CD4 (APC) (BD Biosciences) en una cámara de cultivo de 8 pocillos ibidi® revestida de poli-D-Lisina (Biovalley). Las células se lavaron a continuación dos veces, los núcleos se contratiñeron con DAPI y se adquirieron imágenes digitales de una sección intracelular de 0,3 µm en un microscopio Zeiss Axiovert M200 (objetivo de inmersión de x63) equipado con el ApoTome® y una cámara digital monocromática refrigerada (Zeiss).

[0125] Ensayo de movilización de calcio. Células esplénicas de ratones C57Bl/6 se prepararon tal como se describe en Caligiuri y col., (2005 Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 1659-1664). Las células se incubaron con Fluo-3AM (Invitrogen, # F1242) según las instrucciones del fabricante. La fluorescencia de un trazador unido a calcio se midió en el canal FITC en un citómetro LSRII® (BD Biosciences) antes de y durante 60 segundos después de la adición de anticuerpos monoclonales de hámster anti-CD3/CD28 de ratón (40 µg/ml de cada uno) y compBead® (1:50) de rata/hámster en solitario o en presencia de anticuerpo de rata anti-CD31 de ratón (clon 390, 10 µg/ml) o en presencia del péptido 551-574 de CD31 (100 µM). Los controles negativos incluían isotipo de IgG de rata de control y péptido desordenado. Los anticuerpos y las compBeads® eran de BD Biosciences.

[0126] Resonancia del plasmón superficial. Las constantes de asociación y disociación de unión homófila se calcularon mediante resonancia del plasmón superficial (BIAcore® 2000, GE). En resumen, el péptido 551-574 se revistió a 3400 unidades de resonancia (RU) sobre chips CM5 según las instrucciones del fabricante. El péptido soluble 551-574 (12,5, 25, 50 y 100 µM en 200 µl de HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,005%) se inyectó a 20 µl/min a 25°C, en el canal revestido con péptido y en un canal no revestido. La disociación se monitorizó durante 300 segundos. Las constantes de asociación (kon) y de disociación (koff) se calcularon usando el software BIAevaluation® 3.0 (GE). La inyección del péptido 551-574 en un canal revestido con el péptido desordenado produjo una señal despreciable.

[0127] Evaluación de la inmunorregulación *in vitro*. La actividad citolítica medida por células T CD8⁺ contra células de músculo liso aórtico de ratón alogénicas y la medición de la actividad gelatinasa de macrófagos (MMP-2/9) se realizaron tal como se ha descrito previamente para células humanas en Caligiuri y col. (2006 Arterioscler Thromb Vasc Biol 26: 618-623) usando kits y reactivos de Invitrogen. En resumen, cultivos primarios de células de músculo liso de aorta de ratón FVB/N se marcaron con el trazador lipófilo DIO (verde) y se cocultivaron durante 3 horas con células esplénicas enriquecidas con células T CD8⁺ de ratones C57Bl/6 (n=3 péptido desordenado y n=3 péptido 551-574, 50 µM). La citólisis se evaluó mediante acumulación intracelular de yoduro de propidio (PI). Las células se analizaron mediante citometría de flujo y el % de citólisis se calculó expresando el número de células muertas (PI+) entre las células diana (DIO+). La actividad MMP-2/9 (gelatinasa) intracelular se midió mediante citometría de flujo en macrófagos derivados de médula ósea de 7 días de ratones C57Bl/6 (n=3 péptido desordenado y n=3 péptido 551-574, 50 µM) tres horas después de la incorporación de gelatina OregonGreen® (MFI). La proliferación de células T se realizó usando células mononucleares de sangre periférica humana de células esplénicas de ratones C57Bl/6 (CD31^{+/+}) y CD31^{-/-} (Charles River Francia) tal como se ha descrito previamente (Caligiuri y col. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 1659-1664). En resumen, las células se sembraron por triplicado a 0,2x10⁶ células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo en U en medio completo (RPMI 1640, piruvato al 1%, glutamina al 1%, penicilina-estreptomizina-fungizona al 1%, suero fetal de ternero descomplementado al 10%, todos de Invitrogen) que contienen 1 µg/ml de anticuerpos anti-CD3/CD28 de ratón o 5 µg/ml de anti-CD3 humano (BD) según sea apropiado. CD31 (551-574) y péptido desordenado a 25, 50 y 100 µM de concentración final se depositaron en los pocillos justo antes de la siembra de las células. Las células sembradas en las placas se cultivaron durante 72 horas en CO2 al 5% a 37°C. Se añadió (³H) timidina (0,5 µCi/pocillo) durante las últimas 16 horas y la proliferación se evaluó usando un recogedor Tomtec y se analizaron en un contador Wallac micro beta. Los datos se expresan como media ± SEM de cpm por triplicado.

[0128] Evaluación de inmunoregulación *in vivo*. La supresión de la hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) se evaluó tal como se describe en el documento "Current Protocols in Immunology (2001) 4.0.1-4.0.2 Unit 4.2". En resumen, TNCB (2-cloro-1,3,5-trinitrobenceno, Fluka #79874) se disolvió en acetona/aceite de oliva (1:1 v/v) a una concentración de 10 mg/ml. Ratones BALB/c (n = 6/grupo) se sensibilizaron pintando las regiones afeitadas del abdomen a con un total de 0,2 ml de la preparación (n = 6/grupo). El experimento incluía 3 grupos para el péptido

551-574 (10, 50, 100 μ M) y 1 grupo tratado con péptido desordenado a 100 μ M). Cinco días después de la sensibilización, 10 μ l de la mezcla de TNCB-disolvente se pintaron sobre el pabellón auricular derecho, 30 minutos después de la administración subcutánea (interescapular) del péptido 551-574 o el péptido desordenado. Los incrementos de grosor auricular se calcularon sustrayendo el grosor del pabellón auricular derecho e izquierdo de cada ratón (derecho-izquierdo/izquierdo x 100), medido a las 24 h con un calibre de dial ("Pocotest", Kroeplin Längenmesstechnik). La medición se realizó 5 veces en cada oreja y se promedió para análisis adicional. El efecto inmunosupresor del péptido se calculó como % de supresión = $(1-\Delta TE/\Delta TS) \times 100$, donde ΔT = (grosor de la oreja 24 h después de la estimulación) - (grosor auricular inicial), E= animales sensibilizados, S= animales tratados. Los datos se expresan como media \pm SEM.

[0129] Detección del tamaño de la lesión aterosclerótica y formación de aneurisma. Ratones apolipoproteína E^{-/-} de 28 semanas de edad macho (n=8-10 ratones/grupo) de nuestro centro de cría se mantuvieron en una dieta de pienso normal y se mantuvieron en condiciones estándar. La aceleración de la aterosclerosis y la formación de aneurisma se indujo mediante infusión subcutánea de angiotensina II (Sigma, #A9525) (1 mg/kg/d) durante 28 días usando minibombas osmóticas (Alzet, #2004) tal como se ha descrito previamente (Daugherty y col. J Clin Invest 105: 1605-1612). Todos los experimentos fueron aprobados por nuestro comité ético institucional. El tamaño de las lesiones ateroscleróticas se midió tal como se ha descrito previamente (Caligiuri y col. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 1659-1664). Estos experimentos se repitieron dos veces con resultados similares.

[0130] Péptidos. Todos los experimentos en material humano se llevaron a cabo usando la secuencia peptídica humana, mientras que el equivalente de ratón se usó en todos los experimentos en ratón. Las secuencias de los péptidos se muestran en la tabla a continuación.

Humano	NH2 - NHASSVPRSKILTVRVILAPWKK - COOH	SEQ ID NO: 2
Ratón	NH2 - SSMRTSPRSSTLAVRVFLAPWKK - COOH	SEQ ID NO: 3
Desordenado	NH2 - SMPAVRSRFSATSLVTLKSRWPK - COOH	SEQ ID NO: 4

Ejemplo 2: La aparente pérdida de CD31 en la superficie de linfocitos sanguíneos se debe a su diseminación entre los 5^o y 6^o dominios extracelulares similares a Ig

[0131] Para establecer si la pérdida de CD31 estaba restringida a parte o se extendía a la totalidad de sus 6 dominios extracelulares similares a Ig, se realizó un análisis por citometría de flujo multicolor de leucocitos de sangre completa de 5 donantes sanos usando dos anticuerpos diferentes que reconocen específicamente los dominios similares a Ig distal a la membrana y proximal a la membrana de la molécula. Para poder discriminar entre las diferentes poblaciones de leucocitos y valorar su estado de maduración y activación, un panel de marcadores de linaje, así como la expresión de CD45RA y HLA-DR se usaron simultáneamente. Aunque la expresión de CD31, según se detectó mediante un anticuerpo monoclonal específico para los primeros dominios de CD31 (clon WM-59, dom1-2) se reconoció en células T sanguíneas sin exposición previa pero no en activadas/con memoria, todas las células expresaban el fragmento extracelular proximal a la membrana de la molécula detectada por otro anticuerpo monoclonal específico para el 6^o dominio similar a Ig de CD31 (clon PECAM 1.2, dom6), independientemente de su estado maduración/activación (figura 1).

[0132] La citometría de flujo de células mostraba que el ensamblaje al receptor de células T (TCR) induce un desplazamiento de >80% de células T en reposo sanguíneas desde un fenotipo CD31 dom1⁺dom6⁺ a un fenotipo dom1⁻/dom6⁺ (CD31^{diseminada}). El análisis molecular de las proteínas de membrana de lisados de células T cultivadas demostró que >99% de las moléculas de CD31 unidas a células T no eliminan la parte distal que contiene el dom1 ya 5' minutos después de la estimulación con TCR *in vitro* (figura 2a). El análisis del sobrenadante mostraba que, simultáneamente, una única proteína soluble truncada limitada a los 5 primeros dominios similares a Ig de CD31, se acumula en el sobrenadante de cultivo (figura 2b). Además, el análisis del plasma de los mismos donantes sanos mostraba que la mayor parte de CD31 soluble en plasma estaba constituido por una molécula truncada que comprende dominios similares a Ig 1 a 5 y que carece específicamente del 6^o dominio proximal a la membrana (figura 2b) que siempre permanece anclado a los linfocitos aparentemente CD31-negativos (CD31 dom1⁻) tanto *in vitro* como *in vivo*. Solamente una fracción mínima de CD31 soluble contenía los 6 dominios extracelulares predichos en la variante descrita anteriormente (Goldberger y col. J Biol Chem 269: 17183-17191) cortada y empalmada de ambos en sobrenadante de cultivo y en plasma (figura 2b). No se produce ninguna otra escisión significativa de la molécula cadena arriba del 5^o dominio dado que esta última siempre estaba virtualmente presente de forma concomitante con el primer dominio en las proteínas CD31 solubles truncadas (figura 2b).

[0133] En este caso se demuestra que la pérdida supuesta de la molécula en linfocitos T activados/con memoria es en realidad incompleta y resulta de la diseminación de CD31 entre los 5^o y 6^o dominios extracelulares similares a Ig. La diseminación de CD31 se producía inmediatamente después de la activación celular en linfocitos T y estaba acompañada por la acumulación de la molécula truncada en el sobrenadante junto con niveles vestigiales de la variante cortada y empalmada producida por las células. Este descubrimiento era inesperado, dado que todas las pruebas disponibles en el mercado para detectar CD31 en el plasma usan anticuerpos dirigidos a los dominios 1 a 5 de CD31 y, por lo tanto, no pueden discriminar entre la variante cortada y empalmada (que contiene los 6 dominios extracelulares) y las formas truncadas (dominios 1 a 5) de CD31. El ensayo inmunoabsorbente sustractivo descrito en el presente documento es capaz de discriminar entre las dos formas de CD31 soluble y cuantificar de forma precisa la proporción de cada una de ellas en el plasma. Este ensayo mostraba que la mayor parte de CD31 en plasma comprende los dominios 1 a 5 pero carece del 6^o dominio proximal a la membrana, que permanece anclado a los linfocitos CD31 dom1- sanguíneos. Por lo tanto, se propone referirse a estos linfocitos como CD31 diseminada en lugar de células “negativas” para CD31. Trabajo previo *in vitro* había indicado que la diseminación de CD31 en una posición no identificada N-terminal desde el segmento transmembrana de la molécula puede producirse en células endoteliales que experimentan apoptosis (Ilan y col. 2001. Faseb J 15: 362-372). Por primera vez, se muestra en el presente documento que la diseminación es responsable de la pérdida de CD31 (incompleta) en linfocito sanguíneos y que la CD31 circulante consiste principalmente en una forma truncada derivada de su escisión entre los dominios similares a Ig 5 y 6, en lugar de la forma variante cortada y empalmada secretada. Se han descrito polimorfismos genéticos para CD31, pero el valor predictivo de los niveles de CD31 soluble era conflictivo en aterotrombosis u otras enfermedades dismunitarias. De hecho, aunque la cantidad de la forma cortada y empalmada puede predecirse mediante diferentes variantes genéticas, la proporción de la forma resultante de la diseminación de proteínas no está determinada por el polimorfismo del gen de CD31. Se propone que la disparidad entre los diferentes estudios se debía al hecho de que la CD31 circulante es una mezcla de la variante genética y de la forma truncada y la discriminación entre las dos formas de CD31 no era posible. El procedimiento sustractivo descrito en el presente documento permitirá la diferenciación del valor pronóstico determinado por variantes genéticas de CD31 independientemente del vinculado a diseminación de CD31.

Ejemplo 3: Un péptido contenido en el fragmento de CD31 extracelular residual en células T CD31^{diseminada} mejora la fosforilación del ITIM de CD31

[0134] Un péptido sintético derivado del dom6 de CD31 correspondiente a los 23 aminoácidos de yuxtamembrana (551-574) del ectodominio de la molécula humana se une tanto a CD31 dom1⁺ como a CD31 dom1⁻ (CD31^{diseminada}) de linfocitos T CD4⁺ *ex vivo*. De forma importante, la unión de este péptido en células T tiene consecuencias funcionales sobre el control de células inmunitarias, dado que ejercía inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de células T de sangre periférica humana *in vitro* (figura 3a). Para valorar si el efecto inhibitor del péptido podría estar mediado por unión homófila y ensamblaje de la señalización de CD31, se evaluó el nivel de fosforilación de la ITIM de CD31 tirosina en la posición 686 (⁶⁸⁶ITIM) en células T cultivadas. La estimulación del TCR mediante anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en solitario o la presencia exclusiva del péptido inducía un incremento menor de CD31 pY686 (figura 3b) pero la estimulación de TCR concomitante en presencia del péptido potenciaba la fosforilación de CD31 ⁶⁸⁶ITIM en un factor de >23 (figura 3b).

Ejemplo 4: Detección de CD31 diseminada en plasma de pacientes que padecen aterotrombosis y en individuos no afectados

[0135] La cantidad total de CD31, la cantidad de CD31 diseminada y la cantidad de CD31 cortada y empalmada se ha medido tanto en once individuos que padecen aterotrombosis como en veintitrés individuos no afectados.

[0136] El grupo “Aterotrombosis” comprendía once individuos que padecen dolor torácico en reposo y que presentan una coronariografía anormal.

[0137] El grupo “Sin aterotrombosis” comprendía veintitrés individuos. Se llevó a cabo un sub-análisis en el grupo “Sin aterotrombosis”, que se descubrió que comprendía:

55 - ocho individuos que presentaban una coronariografía normal y un ecodoppler carotídeo normal a pesar del dolor torácico;

- cuatro individuos que presentan una coronariografía normal a pesar del dolor torácico, pero en los que se detectó aterosclerosis mediante ecodoppler carotídeo; y

- once individuos que padecen dolor torácico solamente en esfuerzo y que presentan una coronariografía anormal (es decir que padecen aterosclerosis coronaria sin trombosis).

5 **[0138]** La cantidad total de CD31, la cantidad de CD31 diseminada y la cantidad de CD31 cortada y empalmada se determinó de la siguiente manera.

10 1. La cantidad total (1 µl/prueba) de perlas (E9, acopladas con el clon JC70A, DAKO) se transfirió a un tubo cónico y se centrifugó a 200 g durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó cuidadosamente y se sustituyó por la misma cantidad de tampón de mejora sérica (BD #51-9002150), y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

2. La mezcla de anticuerpos marcados de forma fluorescente (PE-WM59; FITC-HC1/6; PB-PECAM1.2) se preparó, cada uno a 1 µg/ml, 1 µl cada uno/condición.

15 3. Se preparó 1 tubo precondición, conteniendo cada uno 3 µl de una dilución patrón o una muestra de plasma. Las perlas reconstituidas se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó y el tampón de mejora sérica se sustituyó por la mezcla de anticuerpos marcados de forma fluorescente. 3 µl de esta solución se distribuyeron en cada uno de los tubos que contenían la dilución patrón y las muestras, y la solución se incubaron durante 1 hora a 4°C en la oscuridad.

20 4. 150 µl de tampón de lavado (BD # 51-9003797) se añadieron a cada tubo, y se adquirió la señal.

25 **[0139]** Tal como se muestra en la tabla a continuación, el porcentaje de CD31 diseminada era mayor en individuos que padecían aterotrombosis que en individuos no afectados, a pesar del hecho de que todos los individuos estaban padeciendo dolor torácico.

Nivel en plasma de CD31 (ng/ml)	total	corte y empalme	diseminación
Aterotrombosis (n=11)	11,55±0,7	-7,02±2,69	18,57±2,67
Sin aterotrombosis (N=23)	11,58±0,49	5,26±1,850	6,31 ±1,85
Prob. de la Prueba T >F	0,9756	0,0007	0,0006

30 **[0140]** Las cantidades de CD31 totales eran similares en los cuatro grupos, mientras que la cantidad de CD31 diseminada y la cantidad de CD31 cortada y empalmada eran significativamente diferentes en cada comparación de grupos emparejados. La CD31 diseminada se incrementaba en individuos con coronariografía anormal, con los valores más elevados en aquellos que padecen aterotrombosis. El CD31 de corte y empalme seguía estando presente en pacientes que padecían aterosclerosis sin aterotrombosis, mientras que era casi indetectable en pacientes que padecían aterotrombosis.

35 **[0141]** Estos resultados demuestran que los niveles elevados de variantes de corte y empalme solubles de CD31 asociados con niveles bajos de CD31 diseminada indican que el paciente padece dolor torácico inespecífico, asociado eventualmente con placas de ateroma. Un ligero incremento de los niveles de CD31 diseminada asociado con niveles normales o reducidos de variantes de corte y empalme solubles de CD31 indica que el paciente padece aterosclerosis. Un incremento importante de niveles de CD31 diseminada asociado con cantidades indetectables de variantes de corte y empalme solubles de CD31 indica que el paciente padece aterotrombosis.

40 **Ejemplo 5: Uso de perlas CBA® para valoración cuantitativa de la asociación de proteínas y de fosforilación**

8.1. Protocolo usado para valorar la ruta inhibidora dependiente de ITIM de CD31 en células T

45 **[0142]** *Lisis de las células.* Células T Jurkat en fase logarítmica (10×10^6 /ml, 1 ml) se dejaron intactas (control negativo) o se incubaron con Na₃VO₄/H₂O₂ (ortovanadato sódico que es un inhibidor de tirosina fosfatasa, control positivo para fosforilación de tirosina). En paralelo, las células se estimularon con CD3 o con CD3 + CD31 (dominio 2, anticuerpo WM-59) mediante reticulación mediada por anticuerpos. Después de 20' de incubación a 37°C en CO₂ al 5%, las células se lisaron en hielo durante 30' con un tampón RIPA que contenía un cóctel de inhibidores de proteasa y fosfatasa. Los lisados se ultracentrifugaron y los sobrenadantes se usaron directamente o se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -20° para análisis adicional.

[0143] *Captura de la proteína diana sobre un soporte sólido* (1 hora a temperatura ambiente). Esta etapa sigue el principio de inmunoprecipitación pero el complejo de señalización no se desnaturaliza ni se reduce, y no se lleva a cabo electroforesis y/o transferencia. Como soporte sólido, se usaron perlas funcionales CBA® acopladas previamente con un anticuerpo dirigido al dominio similar a Ig 6 de CD31 proximal a la membrana (clon MBC 78.2 también llamado PECAM1.2) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una alícuota de 20 µl de sobrenadante de lisado de cada condición se incubó con 5 µl de PECAM1.2-CBA® durante 1 hora a temperatura ambiente.

[0144] *Detección de moléculas asociadas con CD31 y del estado de fosforilación del ITIM de CD31 686*. Después del lavado de las perlas una vez con tampón de lavado CBA (100 µl/tubo), las perlas se habían dividido en alícuotas en 4 tubos independientes y se incubaron con anticuerpos fluorescentes dirigidos a:

- CD3-FITC;
- CD28-PE;
- dominio 6 de CD31 (PECAM1.2 FITC)
- dominio 2 de CD31 (WM-59 PE)
- fosfotirosina (clon 4G10 FITC);
- fosfoserina/treonina (marcada con FITC)
- CD31 fosfotirosina 686 (anticuerpo secundario policlonal de conejo conjugado con alexafluor 488 anticonejo); o
- SHP2-PE.

[0145] Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, las perlas se lavaron una vez con 100 µl de tampón de lavado CBA y se adquirieron más de 600 perlas usando un software LSR II y DIVA®.

[0146] *4. Análisis*. Se registró la mediana de fluorescencia en cada canal fluorescente. El software DIVA® también calculaba el %CV (coeficiente de variabilidad), que puede considerarse un equivalente del valor de la barra de error para la medición repetida y permite la comparación estadística entre muestras.

8.2. Resultados

[0147] Los resultados se muestran en las tablas a continuación.

		(ng/ml) dom 6 de CD31	(ng/ml) dom 2 de CD31	% diseminado de CD31	MFI pY (4G10)	MFI pSer/PThreo
Control negativo	Sin estimular	19	18	5	485	284
Control pY positivo	Na3VO4/H2O2	103	77	25	1205	324
Activación de células T	Reticulación de CD3	9080	83	99	2681	130
Tratamiento con anticuerpo para CD31	Reticulación de CD3+CD31	2389	46	98	2312	267
Tratamiento con péptido CD31	Reticulación de CD3+péptido CD31	10962¹	67 ²	99	3277³	329

	MFI CD31 pY686	MFI SHP-2	MFI CD3	MFI CD28
Control negativo	1578	165	197	8165
Control pY positivo	10667	193	354	3932
Activación de células T	4198	90	17876	25169
Tratamiento con anticuerpo para CD31	2268	149	<i>2425</i>	<i>17147</i>
Tratamiento con péptido CD31	96632³	185⁴	20096⁵	24306⁵

[0148] Un valor en negrita indica un incremento frente a condiciones de reticulación de CD3, y valores en cursiva indican una disminución.

5 **[0149]** ¹Moléculas de CD31 ensambladas oligomerizan en *cis*. Estando la molécula CD31 fisiológicamente ensambladas como una molécula reguladora en la activación de células T, esto explica el incremento de la cantidad del dominio 6 de CD31 en muestras estimuladas con células T.

10 **[0150]** ²Si solamente se detectó el dominio 2 de CD31, se podría concluir que la cantidad de la molécula capturada era similar en todas las muestras. De hecho, la mayoría de moléculas oligomerizadas en *cis* de CD31 están diseminadas entre el dominio 6 y 2 en el momento de la activación con células T tal como se muestra en la columna “% diseminado”.

15 **[0151]** ³La fosfotirosina total disminuye ligeramente mediante tratamiento con anticuerpo para CD31 mientras que se incrementa ligeramente mediante tratamiento con péptido CD31. De hecho, no solamente pueden fosforilarse el ITIM de CD31, sino también tirosinas presentes en otras proteínas de membrana (por ejemplo CD3 y CD28) que están asociadas con CD31 en el momento de la activación con células T. Las diferencias específicas para fosfoITIM de CD31 podrían detectarse usando anticuerpos dirigidos a fosfoITIM específicos de secuencia. No solamente se incrementa las fosfotirosinas, sino también las fosfoserinas/treoninas. Este aminoácido puede fosforilarse en la cola citoplasmática de CD31, o en una de las moléculas asociadas.

20

[0152] ⁴La cantidad de SHP-2 asociado a CD31 se incrementa en un 50% con el tratamiento con anticuerpo y en un 100% con el tratamiento con péptido.

25 **[0153]** ⁵La cantidad de receptor de activación (CD3) y la molécula co-estimuladora asociada al CD31 (CD28) disminuyen mediante el tratamiento con anticuerpos, mientras que éstas se incrementan mediante el péptido CD31. Esto puede verse como un mecanismo contra-regulador de la célula en vista del drástico incremento de fosforilación de ITIM de CD31 que contrarresta la activación de células T.

30 8.3. Conclusión

[0154] Todos estos datos se adquirieron partiendo de una muy pequeña cantidad de la misma muestra (20 µl). El uso de citometría de flujo multicolor garantiza su análisis de manera simultánea. La disponibilidad de un patrón permite la determinación exacta de cantidades absolutas de cada molécula en el complejo de señalización.

35

[0155] El experimento anterior se llevó a cabo usando anticuerpos conjugados a FITC (FL1) o PE (FL2). El uso de perlas no fluorescentes para la captura de proteínas permite el uso de al menos otros dos fluoróforos para uso en el láser azul (PerCP o PE-Cy7 o PE-Cy5, FL3 y APC o Cy5, FL4). La disponibilidad de láseres adicionales (rojo, violeta, uv) en el citómetro expande adicionalmente la capacidad de este procedimiento. Pueden usarse hasta 40 17 anticuerpos fluorescentes diferentes simultánea y, por lo tanto, hasta 17 parámetros diferentes (proteína de membrana asociada, moléculas de señalización, secuencias fosforiladas) pueden detectarse simultáneamente en la misma muestra, con un potente valor estadístico debido al elevado número de perlas que pueden adquirirse.

45 **[0156]** El procedimiento anterior presenta numerosas ventajas en comparación con los procedimientos de la técnica anterior. La tabla a continuación compara este procedimiento con co-IP/WB, CBAFlex y CASE/Phosphlow.

Operación	IP/WB	CBAFlex	Phoflow /CASE	Procedimiento según la invención
Extracción de proteínas	30 min	30 min	N/A	30 min
Inmunoprecipitación	1-12 h	N/A	N/A	N/A
SDS-PAGE	2 h	N/A	N/A	N/A
Transferencia	2 h	N/A	N/A	N/A
Fijación	N/A	N/A	1 h	N/A
Bloqueo	1 h	N/A	1 h	N/A
Anticuerpo primario	1-18 h	1 h	1 h	1 h
Lavado	30 min	5 min	15 min	0-5 min
Anticuerpo secundario	1 h	N/A	1 h	N/A
Lavado	30 min	N/A	15 min	N/A
Detección de desa.	60min	N/A	15 min	N/A
Adquisición de datos	1 h	<10 s/muestra	15 min	<10 s/muestra
Multi-diana	N/A	hasta 20	≥2	hasta 20
Tiempo	~ 12-36 h	~ 1.5 h	~ 7 h	~1.5 h
Tamaño de muestra	≥100 µl	20-50 µl	≥50 µl	≤5 µl
Interacciones específicas	Sí (1)	N/A	N/A	Sí (≥1)

[0157] En comparación con co-IP/WP, este procedimiento es cuantitativo, directo y mucho más rápido. Además, permite la detección simultánea de la proteína diana, de fosfomoléculas y de moléculas de membrana e intracelulares asociadas. También permite el análisis simultáneo de muchos más parámetros, dado que una transferencia de Western solamente puede rehibridarse un número limitado de veces, mientras que hasta 20 anticuerpos pueden usarse simultáneamente en el marco de este procedimiento con la generación más reciente de citómetros.

[0158] En comparación con CASE/Phosphlow o CBA Flex set, este procedimiento es mucho más específico, dado que la molécula diana es capturada y las interacciones dentro del complejo molecular pueden analizarse. Además, permite la detección simultánea de la proteína diana, de fosfomoléculas y de moléculas de membrana e intracelulares asociadas.

Ejemplo 6: Optimización del protocolo

[0159] 5 µl de muestra se incuban durante 30-60' a 4°C en la oscuridad con 1 µl de una mezcla que contiene perlas CBA funcionales-anticuerpo monoclonal MEM-05 inmovilizado (dominio 5 de CD31, Exbio, Caltag), WM-59 (dominio 2 de CD31) y PECAM 1.2 (también llamado MBC 78.2, dominio 6 de CD31) acoplado a un fluoróforo. Después de la incubación, las perlas se diluyen con 200 µl de tampón diluyente de ensayo y se adquieren. La mediana de la intensidad de fluorescencia del canal de PE y FITC en más de 1000 perlas seleccionadas se analiza en muestras y diluciones sucesivas del patrón (CD31 recombinante, extracelular de longitud completa, R&D Systems). Se obtienen dos curvas patrón con cada uno de los anticuerpos de detección usados simultáneamente con CD31 recombinante para superar cualquier sesgo debido a diferencias de la afinidad de unión de los diversos anticuerpos. Con tres anticuerpos discriminantes dirigidos a los dominios 2, 5 y 6, es posible discriminar CD31 completo de CD31 que carece del dominio 6 (Δ6) de CD31 que carece tanto del dominio 5 como del 6 (Δ5-6).

[0160] Para incrementar la especificidad de la prueba, anticuerpos monoclonales dirigidos al dominio 1 de CD31 (clon JC70A, Dako) se acoplan a perlas de captura. La detección se basa en tres anticuerpos fluorescentes dirigidos al dominio 2 de CD31 (WM-59, BD), el dominio 5 (HC1/6, Biosource) y el dominio 6. PECAM 1.2/MBC 78.2 Purificado se acopla con un fluoróforo adecuado. Con las perlas funcionales actuales, un conjunto óptimo de fluoróforos es FITC, PE y PerCP. Esta combinación permite la medición en cualquier citómetro de láser azul básico (FACScan, FACSCalibur, etc.) disponible en un laboratorio de biología de un hospital.

[0161] Con FITC y PE como fluoróforos (véase el ejemplo 5), el límite de detección más bajo es 3 ng/ml. Esto da como resultado valores negativos de CD31 cortado y empalmado en pacientes que presentan un elevado riesgo de padecer aterotrombosis. En contraste con esto, diferentes fluoróforos pueden conducir a una mayor sensibilidad.

Por lo tanto, se ponen a prueba diferentes combinaciones de fluoróforos y de anticuerpos.

Ejemplo 7: Análisis de la cohorte de BIOcore

5 **[0162]** Se analizó una cohorte de pacientes. Los individuos se clasificaron en diferentes grupos, tal como se describe en el ejemplo 4.

10 **[0163]** El análisis de las células por citometría confirmó que el porcentaje de linfocitos T (CD3+) que presentan un CD31 truncado (diseminado) es significativamente más elevado en pacientes que corren riesgo de acontecimientos coronarios agudos (véase la tabla 1).

Tabla 1

Análisis de una vía de CD31diseminada (% de células CD3) por grupo					
Nivel	- Nivel	Diferencia	CL inferior	CL superior	valor p
ACS	Norm	16,06119	10,7395	21,38292	<0,0001*
ACS	Carotídeo	15,99231	9,6004	22,38419	<0,0001*
ACS	SA	12,79007	7,9876	17,59257	<0,0001*
SA	Norm	3,27111	-2,2928	8,83498	0,2462
SA	Carotídeo	3,20223	-3,3926	9,797,9	0,3377
Carotídeo	Norm	0,06888	-6,9132	7,05092	0,9844

15 **[0164]** En la tabla anterior, “ACS” significa síndromes coronarios agudos, “Carotídeo” significa aterosclerosis periférica, “Norm” significa angiograma coronario normal, y “SA” significa angina estable.

20 **[0165]** El análisis de subpoblaciones mostraba que esta conclusión es válida tanto para células T CD4+ (CD3+) como para células T CD8+ (CD3+) (véase las tablas 2 y 3, respectivamente).

Tabla 2

Análisis de una vía de CD31diseminada (% de células CD4) por grupo					
Nivel	- Nivel	Diferencia	CL inferior	CL superior	valor p
ACS	Carotídeo	26,37179	18,2050	34,53856	<0,0001*
ACS	Norm	19,24452	12,4451	26,04397	<0,0001*
ACS	SA	16,43631	10,3003	22,57235	<0,0001*
SA	Carotídeo	9,93548	1,5094	18,36157	0,0213*
Norm	Carotídeo	7,12727	-1,7935	16,04806	0,1161
SA	Norm	2,80821	-4,3006	9,91704	0,4351

Tabla 3

25

Análisis de una vía de CD31diseminada (% de células CD8) por grupo					
Nivel	- Nivel	Diferencia	CL inferior	CL superior	valor p
ACS	Carotídeo	8,364103	2,10954	14,61867	0,0093*
ACS	Norm	6,664452	1,45706	11,87185	0,0126*
ACS	SA	4,435567	-0,26376	9,13489	0,0640
SA	Carotídeo	3,928536	-2,52463	10,38171	0,2300
SA	Norm	2,228886	-3,21545	7,67322	0,4186
Carotídeo	Carotídeo	1,699650	-5,13239	8,53169	0,6227

[0166] El análisis de plasma también confirmó que el nivel de CD31 soluble total no es capaz de discriminar entre los grupo (véase la tabla 4).

Tabla 4

Análisis de una vía de total soluble CD31 (ng/ml) por grupo					
Nivel	- Nivel	Diferencia	CL inferior	CL superior	valor p
Norm	ACS	1,017336	-0,71748	2,752148	0,2474
Norm	SA	0,965691	-0,84806	2,779439	0,2934
Norm	Carotídeo	0,825823	-1,45023	3,101875	0,4733
Carotídeo	ACS	0,191513	-1,89216	2,275182	0,8557
Carotídeo	SA	0,139868	-2,00997	2,289702	0,8976
SA	ACS	0,051645	-1,51391	1,617195	0,9480

- 5 **[0167]** Solamente el procedimiento según la invención, que permite medir CD31 cortada y empalmada y CD31 diseminada en plasma, puede emplearse para diagnosticar y/o pronosticar síndromes coronarios agudos (véase las tablas 5 y 6, respectivamente).

Tabla 5

Análisis de una vía de CD31 cortada y empalmada (ng/ml) por grupo					
Nivel	- Nivel	Diferencia	CL inferior	CL superior	valor p
Norm	ACS	4,723988	1,97055	7,477428	0,0010*
SA	ACS	3,288827	0,80403	5,773619	0,0100*
Carotídeo	ACS	3,255752	-0,05138	6,562888	0,0536
Norm	Carotídeo	1,468236	-2,14424	5,080714	0,4220
Norm	SA	1,435162	-1,44356	4,313886	0,3250
SA	Carotídeo	0,033074	-3,37908	3,445224	0,9847

10

Tabla 6

Análisis de una vía de CD31 diseminada (ng/ml) por grupo					
Nivel	- Nivel	Diferencia	CL inferior	CL superior	valor p
ACS	Norm	3,707532	0,87674	6,538321	0,0108*
ACS	SA	3,238062	0,68347	5,792657	0,0135*
ACS	Carotídeo	3,065120	-0,33492	6,465159	0,0767*
Carotídeo	Norm	0,642412	-3,07155	4,356373	0,7322
SA	Norm	0,469470	-2,49012	3,429064	0,7537
Carotídeo	SA	0,172942	-3,33506	3,680946	0,9223

- 15 **[0168]** En particular, la proporción de CD31 soluble diseminada (% de total) es muy útil para distinguir entre síndrome coronario agudo, enfermedad coronaria estable y aterosclerosis periférica (véase la tabla 7).

Tabla 7

Análisis de una vía de CD31 diseminada (% de formas solubles totales de CD31) por grupo					
Nivel	- Nivel	Diferencia	CL inferior	CL superior	valor p
ACS	Norm	22,00424	8,4993	35,50915	0,0017*
ACS	Carotídeo	18,24801	2,0274	34,46865	0,0278*
ACS	SA	18,06073	5,8735	30,24799	0,0041*
SA	Norm	3,94351	-10,1759	18,06290	0,5808
Carotídeo	Norm	3,75623	-13,9620	21,47449	0,6750
SA	Carotídeo	0,18729	-16,5484	16,92299	0,9823

- 20 **[0169]** De forma importante, se descubrió también que la medición en el plasma de pacientes de CD31 cortada y empalmada y de diseminada, y no del CD31 total, permite predecir la recurrencia de acontecimientos cardiovasculares adversos mayores (MACE, tales como muerte, infarto de miocardio letal y no letal).

Tabla 8

Análisis de una vía de:	Prueba de 1 vía, Aproximación de ChiCuadrado		
	ChiCuadrado	DF	Prob>ChiCuad
CD31 total (ng/ml) mediante MACE	0,1564	1	0,6925
CD31 cortada y empalmada (ng/ml) mediante MACE	5,0064	1	0,0253*
CD31 diseminada (ng/ml) mediante MACE	4,4985	1	0,0339*

Ejemplo 8: CD31 diseminada como marcador de diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades inflamatorias

5 [0170] Se investigó si la medición de CD31 soluble cortada y empalmada y diseminada usando el procedimiento de la invención podría ayudar a evaluar el riesgo de fracaso del tratamiento en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas.

10 [0171] Se recopilaron datos de 73 pacientes afectados de artritis reumatoide o espondiloartritis.

[0172] Se descubrió que los niveles en plasma de CD31 estaban asociados tanto con el desenlace clínico del paciente como con una respuesta positiva a bioterapia (véase la figura 6A). Esto no puede predecirse mediante los biomarcadores usados actualmente (ESR y CRP).

15 [0173] Los pacientes anteriores que padecían inflamación muy grave. En dichos casos, el nivel de CD31 diseminada puede incrementarse varias veces por encima de los niveles iniciales (incluso por encima de 1000 ng/ml), y en consecuencia causar un incremento significativo de CD31 soluble total. Por lo tanto, no solamente CD31 diseminada sino también CD31 soluble total puede usarse como biomarcador para inflamación cuando la inflamación es muy grave.

20 [0174] Sin embargo, se requiere diferenciar CD31 diseminada de CD31 soluble total en pacientes en los que el estado inflamatorio es menos obvio.

Ejemplo 9: Medición de los niveles en plasma de GPVI soluble

25 [0175] El procedimiento desvelado en el presente documento se adaptó para medir los niveles en plasma de GPVI soluble. La forma soluble de GPVI se escinde de plaquetas en el momento de la activación y que podría evaluar la aparición de la formación de trombo en pacientes en riesgo.

30 [0176] Se ha establecido un procedimiento reproducible para medir GPVI diseminada en el plasma usando (i) un anticuerpo para captura (acoplado a las perlas CBA); y (ii) un ligando natural marcado de forma fluorescente de GPVI (convulxina) para la detección. El anticuerpo para captura fue el clon No. 3j24.2 o el clon No. 9012.2. Estos dos anticuerpos monoclonales se describen en la solicitud de patente N.º PCT/US2000/018152, publicada como WO/2001/000810. Estos anticuerpos reconocen específicamente epítomos ubicados en el ectodominio de GPVI.

35 [0177] Ningún ELISA actual puede alcanzar la sensibilidad y precisión de este nuevo procedimiento (véase la figura 6B). Pueden obtenerse curvas patrón tanto con dímeros de GPVI recombinantes como con monómeros de GPVI recombinantes. Este descubrimiento es valioso, dado que GPVI dimeriza en el momento de la activación plaquetaria, justo antes de escindir. Después de la diseminación circula tanto en forma de un dímero como en forma de un monómero, y la función y/o el valor de diagnóstico podrían diferir dependiendo del estado de dimerización.

40 [0178] Los procedimientos desvelados en el presente documento permiten, de este modo, medir dímeros y monómeros de GPVI diseminada en el plasma de individuos.

45 [0179] Detectar específicamente la forma diseminada de GPVI puede llevarse cabo de la siguiente manera. La forma cortada y empalmada de GPVI comprende la cola citoplasmática y puede detectarse, por lo tanto, usando anticuerpos específicos que reconocen la cola citoplasmática, tales como los generados contra una proteína de fusión de proteína de unión a maltosa (MBP)-cola citoplasmática de GPVI (Suzuki-Inoue y col. J Biol Chem. 2002 277: 21561-6.). Por otro lado, la forma diseminada de GPVI comprende el ectodominio completo. Por lo tanto, los procedimientos desvelados en el presente documento se realizan usando anticuerpos específicos (anti-cola y anti-ectodominio) en perlas independientes para la captura y convulxina marcada de forma fluorescente para la

50

detección, o viceversa (captura mediante perlas acopladas a convulxina y detección mediante anticuerpos anti-cola y anti-ectodominio fluorescentes marcados de forma diferente).

LISTA DE SECUENCIAS

- 5
- [0180]**
- <110> INSERM
- 10 <120> DETECCIÓN DE CD31 DISEMINADA, DIAGNÓSTICO DE ATEROTROMBOSIS Y TRASTORNOS AUTOINMUNITARIOS, Y PROCEDIMIENTOS PARA ANALIZAR RUTAS DE SEÑALIZACIÓN
- <130> BET 09P0786
- 15 <150> EP 08305361.1
< 151 > 30-06-2008
- <150> EP 09305116.7
<151> 09-02-2009
- 20 <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.4
- 25 <210> 1
<211> 738
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 30 <220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(27)
- <220>
- 35 <221> DOMINIO
<222> (28)..(601)
<223> dominio extracelular
- <220>
- 40 <221> DOMINIO
<222> (34)..(121)
<223> Primer dominio similar a Ig
- <220>
- 45 <221> DOMINIO
<222> (145)..(233)
<223> Segundo dominio similar a Ig
- <220>
- 50 <221> DOMINIO
<222> (236)..(315)
<223> Tercer dominio similar a Ig
- <220>
- 55 <221> DOMINIO
<222> (328)..(401)
<223> Cuarto dominio similar a Ig
- <220>

- <221> DOMINIO
- <222> (424)..(493)
- <223> Quinto dominio similar a Ig

- 5 <220>
- <221> DOMINIO
- <222> (499)..(591)
- <223> Sexto dominio similar a Ig

- 10 <220>
- <221> DOMINIO
- <222> (592)..(601)
- <223> Dominio yuxtamembrana

- 15 <220>
- <221> DOMINIO
- <222> (602)..(620)
- <223> dominio transmembrana

- 20 <220>
- <221> DOMINIO
- <222> (621)..(738)
- <223> citoplasmático

- 25 <400> 1

Met Gln Pro Arg Trp Ala Gln Gly Ala Thr Met Trp Leu Gly Val Leu
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Leu Leu Cys Ser Ser Leu Glu Gly Gln Glu Asn Ser Phe
 20 25 30

Thr Ile Asn Ser Val Asp Met Lys Ser Leu Pro Asp Trp Thr Val Gln
 35 40 45

Asn Gly Lys Asn Leu Thr Leu Gln Cys Phe Ala Asp Val Ser Thr Thr
 50 55 60

Ser His Val Lys Pro Gln His Gln Met Leu Phe Tyr Lys Asp Asp Val
 65 70 75 80

Leu Phe Tyr Asn Ile Ser Ser Met Lys Ser Thr Glu Ser Tyr Phe Ile
85 90 95

Pro Glu Val Arg Ile Tyr Asp Ser Gly Thr Tyr Lys Cys Thr Val Ile
100 105 110

Val Asn Asn Lys Glu Lys Thr Thr Ala Glu Tyr Gln Leu Leu Val Glu
115 120 125

Gly Val Pro Ser Pro Arg Val Thr Leu Asp Lys Lys Glu Ala Ile Gln
130 135 140

Gly Gly Ile Val Arg Val Asn Cys Ser Val Pro Glu Glu Lys Ala Pro
145 150 155 160

Ile His Phe Thr Ile Glu Lys Leu Glu Leu Asn Glu Lys Met Val Lys
165 170 175

Leu Lys Arg Glu Lys Asn Ser Arg Asp Gln Asn Phe Val Ile Leu Glu
180 185 190

Phe Pro Val Glu Glu Gln Asp Arg Val Leu Ser Phe Arg Cys Gln Ala
195 200 205

Arg Ile Ile Ser Gly Ile His Met Gln Thr Ser Glu Ser Thr Lys Ser
210 215 220

Glu Leu Val Thr Val Thr Glu Ser Phe Ser Thr Pro Lys Phe His Ile
225 230 235 240

Ser Pro Thr Gly Met Ile Met Glu Gly Ala Gln Leu His Ile Lys Cys
245 250 255

Thr Ile Gln Val Thr His Leu Ala Gln Glu Phe Pro Glu Ile Ile Ile
260 265 270

Gln Lys Asp Lys Ala Ile Val Ala His Asn Arg His Gly Asn Lys Ala
275 280 285

Val Tyr Ser Val Met Ala Met Val Glu His Ser Gly Asn Tyr Thr Cys
290 295 300

Lys Val Glu Ser Ser Arg Ile Ser Lys Val Ser Ser Ile Val Val Asn
305 310 315 320

Ile Thr Glu Leu Phe Ser Lys Pro Glu Leu Glu Ser Ser Phe Thr His
325 330 335

Leu Asp Gln Gly Glu Arg Leu Asn Leu Ser Cys Ser Ile Pro Gly Ala
340 345 350

Pro Pro Ala Asn Phe Thr Ile Gln Lys Glu Asp Thr Ile Val Ser Gln
355 360 365

Thr Gln Asp Phe Thr Lys Ile Ala Ser Lys Ser Asp Ser Gly Thr Tyr
370 375 380

Ile Cys Thr Ala Gly Ile Asp Lys Val Val Lys Lys Ser Asn Thr Val
385 390 395 400

Gln Ile Val Val Cys Glu Met Leu Ser Gln Pro Arg Ile Ser Tyr Asp
405 410 415

Ala Gln Phe Glu Val Ile Lys Gly Gln Thr Ile Glu Val Arg Cys Glu
420 425 430

Ser Ile Ser Gly Thr Leu Pro Ile Ser Tyr Gln Leu Leu Lys Thr Ser
435 440 445

Lys Val Leu Glu Asn Ser Thr Lys Asn Ser Asn Asp Pro Ala Val Phe
450 455 460

Lys Asp Asn Pro Thr Glu Asp Val Glu Tyr Gln Cys Val Ala Asp Asn
465 470 475 480

Cys His Ser His Ala Lys Met Leu Ser Glu Val Leu Arg Val Lys Val
485 490 495

Ile Ala Pro Val Asp Glu Val Gln Ile Ser Ile Leu Ser Ser Lys Val
500 505 510

Val Glu Ser Gly Glu Asp Ile Val Leu Gln Cys Ala Val Asn Glu Gly
515 520 525

Ser Gly Pro Ile Thr Tyr Lys Phe Tyr Arg Glu Lys Glu Gly Lys Pro
530 535 540

Phe Tyr Gln Met Thr Ser Asn Ala Thr Gln Ala Phe Trp Thr Lys Gln
545 550 555 560

Lys Ala Ser Lys Glu Gln Glu Gly Glu Tyr Tyr Cys Thr Ala Phe Asn
565 570 575

Arg Ala Asn His Ala Ser Ser Val Pro Arg Ser Lys Ile Leu Thr Val
580 585 590

Arg Val Ile Leu Ala Pro Trp Lys Lys Gly Leu Ile Ala Val Val Ile
595 600 605

Ile Gly Val Ile Ile Ala Leu Leu Ile Ile Ala Ala Lys Cys Tyr Phe
610 615 620

Leu Arg Lys Ala Lys Ala Lys Gln Met Pro Val Glu Met Ser Arg Pro
625 630 635 640

Ala Val Pro Leu Leu Asn Ser Asn Asn Glu Lys Met Ser Asp Pro Asn
645 650 655

Met Glu Ala Asn Ser His Tyr Gly His Asn Asp Asp Val Arg Asn His
660 665 670

Ala Met Lys Pro Ile Asn Asp Asn Lys Glu Pro Leu Asn Ser Asp Val
675 680 685

Gln Tyr Thr Glu Val Gln Val Ser Ser Ala Glu Ser His Lys Asp Leu
690 695 700

Gly Lys Lys Asp Thr Glu Thr Val Tyr Ser Glu Val Arg Lys Ala Val
705 710 715 720

Pro Asp Ala Val Glu Ser Arg Tyr Ser Arg Thr Glu Gly Ser Leu Asp
725 730 735

5 <210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> péptido CD31 derivado de ser humano
<400> 2

Asn His Ala Ser Ser Val Pro Arg Ser Lys Ile Leu Thr Val Arg Val
1 5 10 15

Ile Leu Ala Pro Trp Lys Lys
20

15 <210> 3
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> péptido CD31 derivado de ratón
<400> 3

Ser Ser Met Arg Thr Ser Pro Arg Ser Ser Thr Leu Ala Val Arg Val
1 5 10 15

25 Phe Leu Ala Pro Trp Lys Lys
20

<210> 4

<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> péptido desordenado

<400> 4

Ser Met Pro Ala Val Arg Ser Arg Phe Ser Ala Thr Ser Leu Val Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ser Arg Trp Pro Lys
20

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar un ectodominio diseminado de una proteína transmembrana CD31 entre formas solubles de dicha proteína transmembrana en una muestra biológica, en el que dichas formas solubles incluyen una variante de corte y empalme soluble de dicha proteína transmembrana y opcionalmente dicho ectodominio diseminado, que comprende las etapas de:
- 5
- a) proporcionar un primer tipo de perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente tanto en dicho ectodominio diseminado como en dicha variante de corte y empalme (primer anticuerpo discriminante);
- 10
- b) proporcionar al menos un segundo tipo de perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente en dicha variante de corte y empalme y ausente de dicho ectodominio diseminado (segundo anticuerpo discriminante);
- 15
- c) proporcionar un ligando marcado de forma fluorescente que se une específicamente a una región que está presente tanto en dicho ectodominio diseminado como en dicha variante de corte y empalme (ligando de señalización);
- 20
- d) poner en contacto dichos anticuerpos con una muestra biológica que es probable que contenga dichas formas solubles de dicha proteína transmembrana;
- e) para cada tipo de perla, medir la señal obtenida con dicha marca fluorescente mediante citometría de flujo; y
- 25
- f) comparar la señal obtenida para cada tipo de perla;
- en el que una diferencia en las señales medidas en la etapa (e) indica que la muestra biológica comprende dicho ectodominio diseminado.
- 30
2. Un procedimiento para detectar un ectodominio diseminado de una proteína transmembrana CD31 entre formas solubles de dicha proteína transmembrana en una muestra biológica, en el que dichas formas solubles incluyen una variante de corte y empalme soluble de dicha proteína transmembrana y opcionalmente dicho ectodominio diseminado, que comprende las etapas de:
- 35
- a) proporcionar una perla enlazada a un ligando que se une específicamente a una región que está presente tanto en dicho ectodominio diseminado como en dicha variante de corte y empalme (ligando de captura);
- b) proporcionar un primer tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente tanto en dicho ectodominio diseminado como en dicha variante de corte y empalme (primer anticuerpo discriminante);
- 40
- c) proporcionar al menos un segundo tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente en dicha variante de corte y empalme y ausente de dicho ectodominio diseminado (segundo anticuerpo discriminante);
- 45
- d) poner en contacto dichos anticuerpos con una muestra biológica que es probable que contenga dichas formas solubles de dicha proteína transmembrana;
- e) para cada marca fluorescente, medir la señal obtenida con dicha marca fluorescente mediante citometría de flujo; y
- 50
- f) comparar la señal obtenida para cada marca fluorescente
- en el que una diferencia en las señales medidas en la etapa (e) indica que la muestra biológica comprende dicho ectodominio diseminado.
- 55
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que:
- i) dichas formas solubles incluyen al menos tres formas solubles;

ii) los anticuerpos discriminantes se seleccionan de tal manera que discriminen entre dichas formas solubles; y

iii) el ligando de captura o el ligando de señalización se une específicamente a una región que está presente en todas dichas formas solubles.

5 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho ligando de captura o ligando de señalización es un anticuerpo.

10 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además la etapa de calcular el porcentaje y/o la cantidad de dichas formas solubles que corresponde a dicho ectodominio diseminado.

15 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además la etapa de calcular la relación de ectodominio diseminado con respecto a formas solubles, o la relación de variante de corte y empalme soluble con respecto a formas solubles.

20 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el primer anticuerpo discriminante se une específicamente a un epítipo ubicado en el primer dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31, y en el que el segundo anticuerpo discriminante se une específicamente a un epítipo ubicado en el sexto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31.

25 8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que los anticuerpos discriminantes comprenden además un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en el quinto dominio extracelular similar a inmunoglobulina de CD31.

30 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicha muestra biológica se obtiene del plasma de un individuo que padece o que corre el riesgo de padecer un trastorno trombótico o autoinmunitario.

35 10. Un procedimiento para diagnosticar si un individuo padece, o corre el riesgo de padecer, un trastorno trombótico o autoinmunitario, que comprende la etapa de detectar un ectodominio diseminado de CD31 en el que el 6º dominio extracelular similar a Ig está ausente en una muestra biológica de dicho individuo, en el que la presencia de dicho ectodominio diseminado de CD31 indica que dicho individuo padece o corre el riesgo de padecer dicho trastorno trombótico o autoinmunitario.

40 11. El método de la reivindicación 10, en el que dicha etapa de detectar un ectodominio diseminado de CD31 se repite al menos en dos puntos en el tiempo diferentes para monitorizar la progresión de dicho trastorno en dicho individuo, y/o para valorar la gravedad de dicho trastorno en dicho individuo, y/o para monitorizar la respuesta de dicho individuo a un fármaco.

45 12. Un procedimiento para monitorizar la respuesta de un paciente a un fármaco, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a) detectar ectodominios diseminados de CD31 en los que el 6º dominio extracelular similar a Ig está ausente en una muestra biológica de dicho paciente antes y después del inicio de un tratamiento de dicho paciente con dicho fármaco;

b) comparar los niveles de ectodominios diseminados de CD31 detectados en la etapa (a); y, opcionalmente,

50 c) correlacionar una diferencia en dichos niveles de ectodominios diseminados de CD31 con la eficacia del fármaco para tratar a dicho paciente;

55 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que dicha etapa de detectar un ectodominio diseminado de CD31 se realiza según el método tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

14. Un kit de diagnóstico que comprende:

i) un primer tipo de perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente tanto en un ectodominio diseminado de una proteína transmembrana CD31 como en una variante

de corte y empalme soluble de dicha proteína transmembrana;

5 ii) un segundo tipo de perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente en dicha variante de corte y empalme soluble y ausente de dicho ectodominio diseminado; y

iii) un anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente tanto en dicho ectodominio diseminado como en dicha variante de corte y empalme soluble.

10 15. Un kit de diagnóstico que comprende:

i) una perla enlazada a un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente tanto en un ectodominio diseminado de una proteína transmembrana CD31 como en una variante de corte y empalme soluble de dicha proteína transmembrana;

15 ii) un primer tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente en dicha variante de corte y empalme soluble y ausente de dicho ectodominio diseminado; y

20 iii) un segundo tipo de anticuerpo marcado de forma fluorescente que se une específicamente a un epítipo ubicado en una región que está presente tanto en dicho ectodominio diseminado como en dicha variante de corte y empalme soluble.

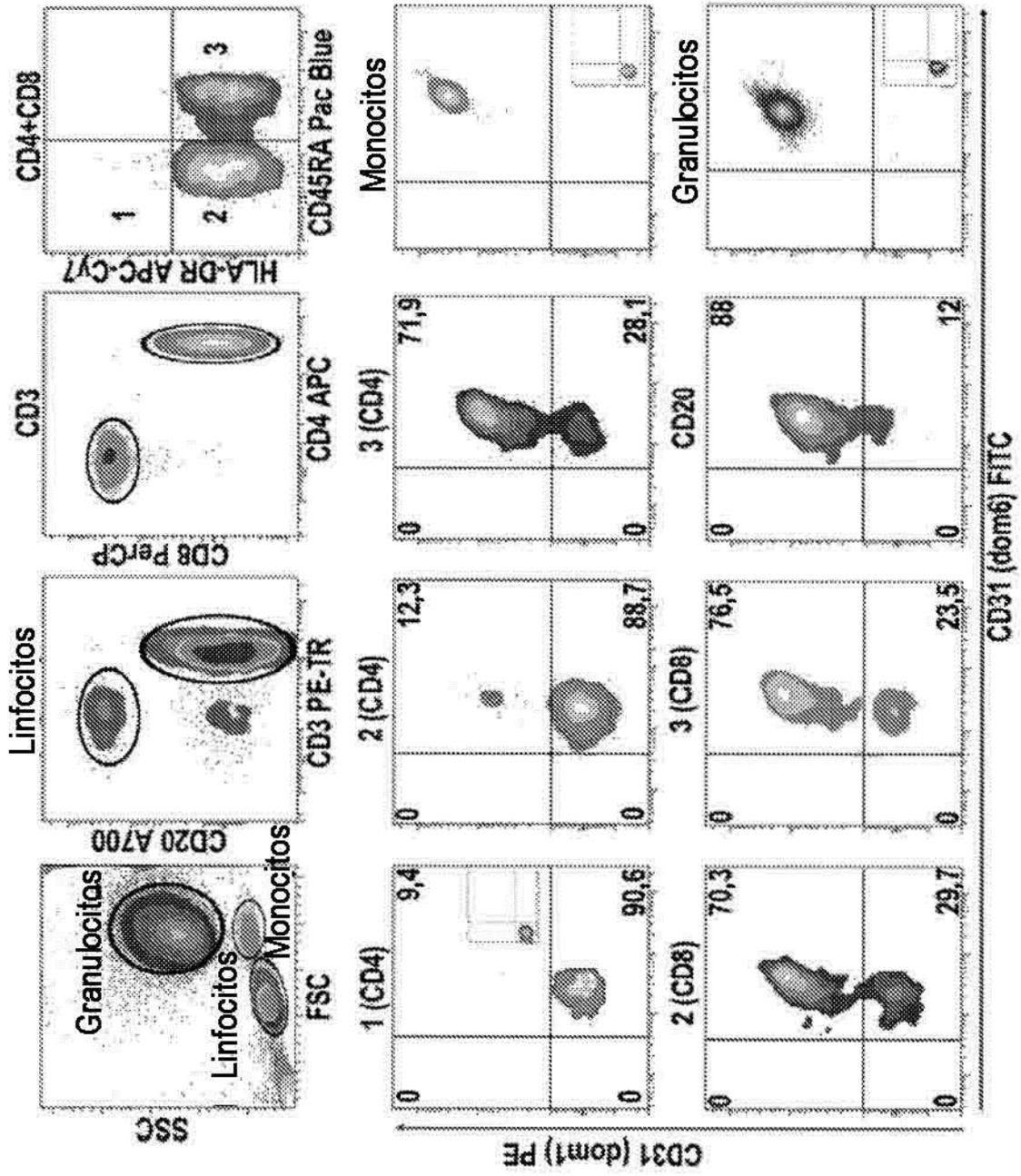


FIG.1

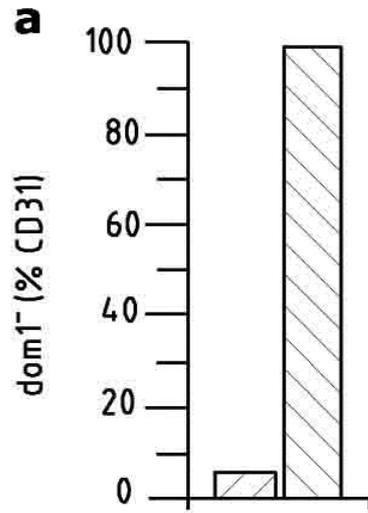
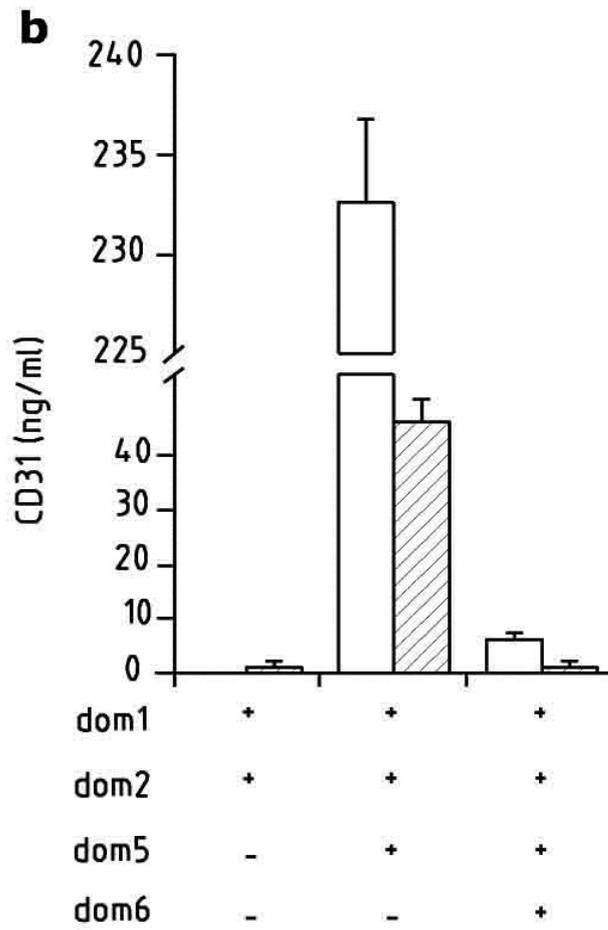


FIG.2



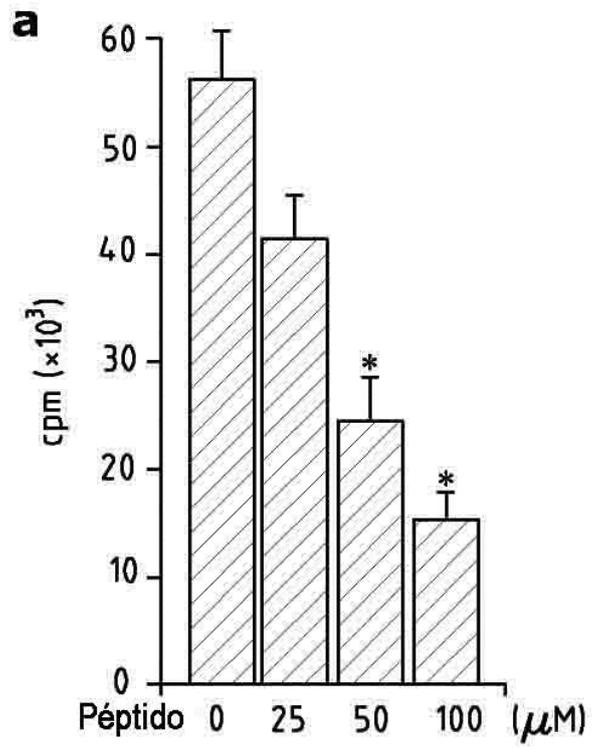
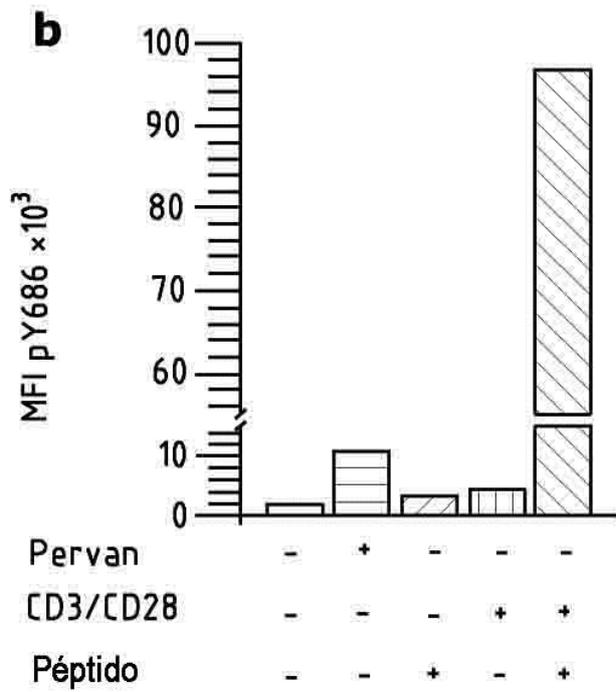


FIG.3



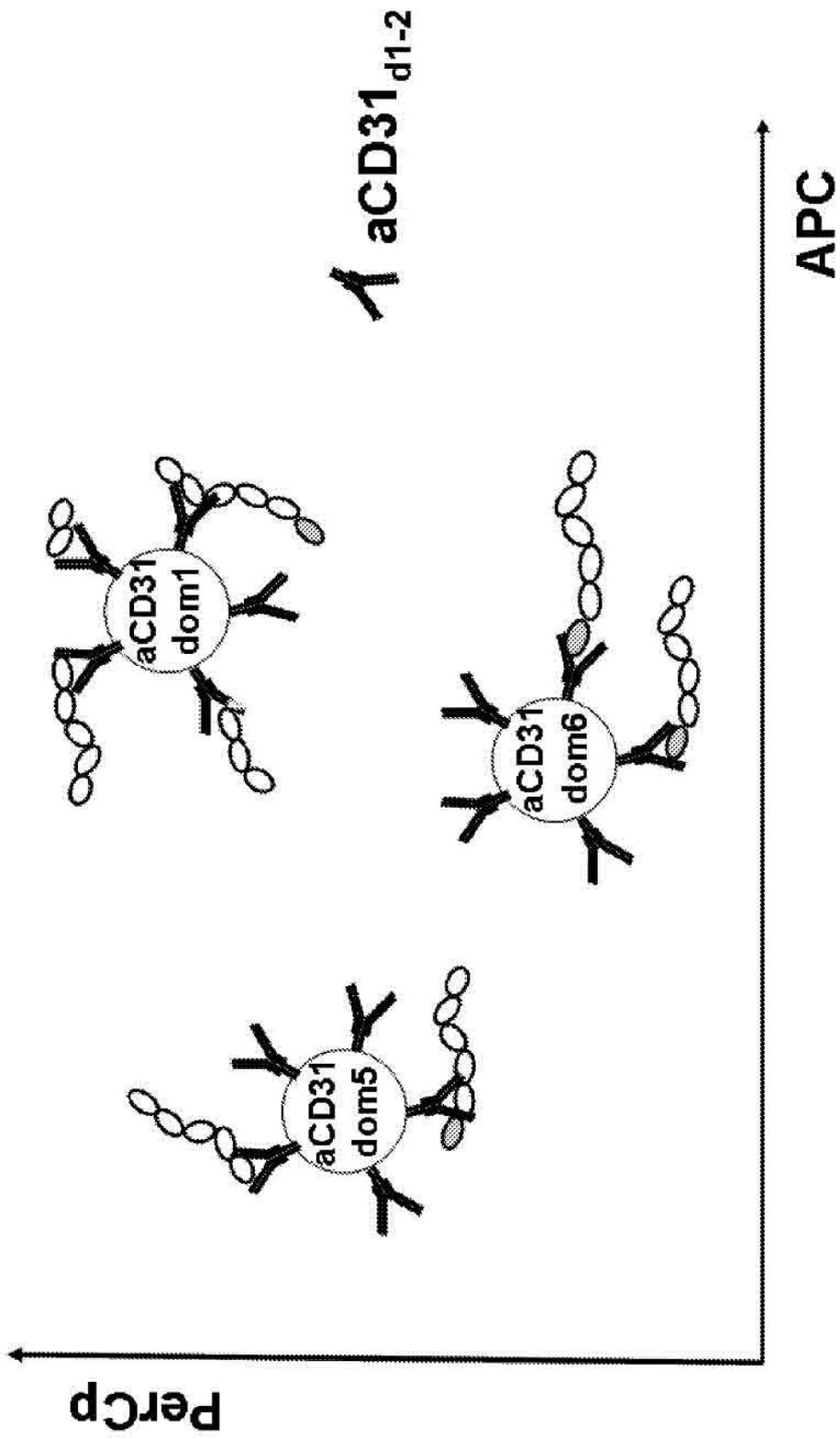


FIG.4

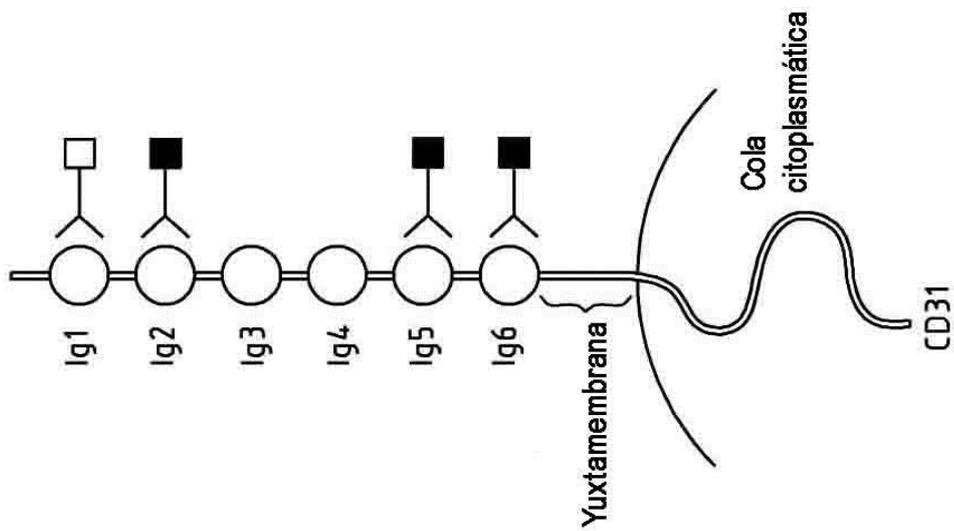
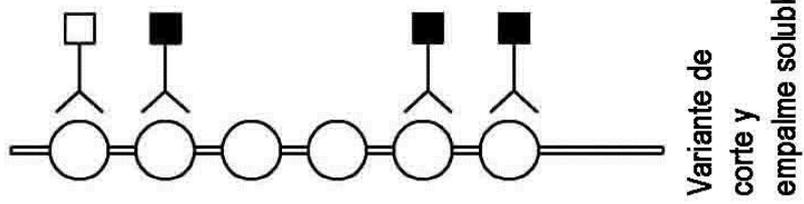
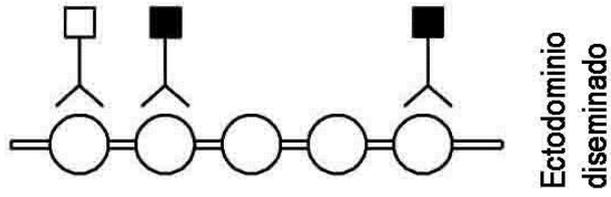
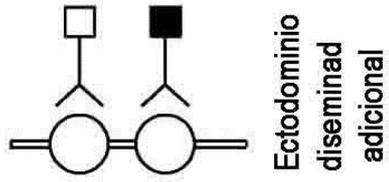


FIG.5

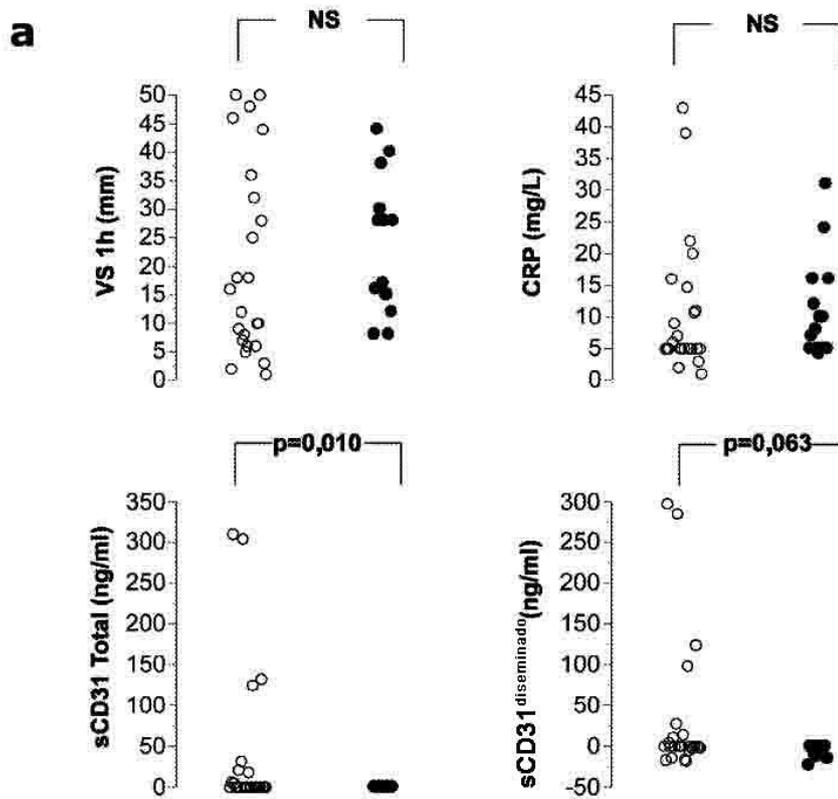


FIG.6

