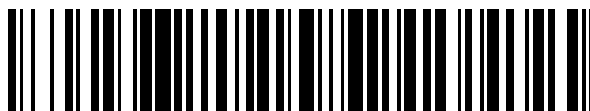


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 863**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2012 PCT/NL2012/050132**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12121594**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2012 E 12709398 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2681561**

54 Título: **Métodos y medios para monitorizar la alteración de la homeostasis tisular en el cuerpo total**

30 Prioridad:

04.03.2011 EP 11157001

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

04.08.2017

73 Titular/es:

**ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER
ROTTERDAM (50.0%)
Dr. Molewaterplein 50
3015 GD Rotterdam, NL y
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VAN DONGEN, JACOBUS JOHANNES MARIA y
ORFAO DE MATOS CORREIA E VALE, JOSÉ
ALBERTO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 628 863 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

Métodos y medios para monitorizar la alteración de la homeostasis tisular en el cuerpo total

5 La invención se refiere al campo del diagnóstico médico. Proporciona nuevas herramientas, incluyendo kits de diagnóstico y métodos para el escaneo total del cuerpo, con el objetivo, entre otras cosas de evaluar procesos fisiológicos, relacionadas con el estilo de vida y al ambiente, diagnóstico y seguimiento tempranos de enfermedades y su tratamiento.

10 La exploración de cuerpo completo es una exploración del cuerpo entero del sujeto para dar soporte al diagnóstico y tratamiento de condiciones y enfermedades. También puede conocerse como una TC de cuerpo completo si se utiliza la tecnología de tomografía computarizada (TAC), aunque existen muchos tipos de tecnología de imágenes médicas que pueden realizar exploraciones de todo el cuerpo. Una exploración de cuerpo completo puede en teoría captar enfermedades mortales (por ejemplo, cáncer) en etapas tempranas, lo que puede salvar vidas. Sin embargo, en la práctica, los beneficios de las exploraciones corporales totales actualmente conocidas pueden no compensar los riesgos y costes. Por lo tanto, la controversia surge del uso de exploraciones de cuerpo completo en la criba de pacientes que no han sido diagnosticados con una enfermedad, o que no tienen síntomas que sugieran una enfermedad. Al igual que con cualquier prueba de detección de la enfermedad, los riesgos de la TC de cuerpo completo deben ser sopesados frente al beneficio de la identificación de una enfermedad tratable en una etapa temprana. En comparación con la mayoría de los otros procedimientos diagnósticos de rayos X, las tomografías computarizadas resultan en una exposición a la radiación relativamente alta, que puede estar asociada con un aumento muy pequeño pero significativo en la posibilidad de desarrollar cáncer más tarde en la vida de una persona. Es importante destacar que las técnicas de imagen actuales requieren equipo costoso con el que sólo se puede analizar un sujeto a la vez. Por el contrario, las pruebas de sangre se pueden realizar en paralelo para muchas personas y la instrumentación requerida está ampliamente disponible en muchos laboratorios de diagnóstico. Además, para las pruebas de sangre el paciente no necesita viajar al centro de cribado, pero la recolección local y el transporte posterior de una muestra de sangre es suficiente.

25 Los presentes inventores reconocen la necesidad de medios y métodos alternativos para escanear el cuerpo entero de un sujeto en el que el riesgo se supera en gran medida por el beneficio de identificar una enfermedad tratable en una etapa temprana. Ellos desarrollaron un sistema conceptualmente novedoso para la exploración corporal total dirigida a la evaluación de los procesos fisiológicos, el cribado del estado de salud en general, y el diagnóstico temprano y la monitorización de las enfermedades y su manejo (por ejemplo, el tratamiento). Se trata de un Flow Cytometric Body Scan (FlowBoScan) o Tissue Macrophage Scan (TiMaScan) utilizando macrófagos tisulares en la sangre como un espejo de la homeostasis de tejido interrumpida y enfermedad. La nueva herramienta no implica ninguna exposición del cuerpo a radiación nociva. En contraste, el TiMaScan se puede realizar en muestras de cuerpo fácilmente accesibles, tales como sangre periférica.

35 Todos los compartimentos tisulares en cuerpos humanos y animales se mantienen mediante un delicado equilibrio homeostático de proliferación celular y muerte celular, principalmente muerte celular programada por apoptosis (tipo I) y autofagia (tipo II). Dependiendo del tipo de tejido, las actividades de homeostasis son más altas o más bajas. Por ejemplo, las células epiteliales en el intestino, las células hematopoyéticas en la médula ósea y el epitelio de la piel tienen un alto rendimiento, mientras que este volumen de rendimiento es menor en otros tejidos como el sistema nervioso, el hígado, el riñón y los músculos. Sin embargo, en todos los tejidos se mantiene la homeostasis celular, ya sea en un nivel alto o bajo de homeostasis. Además del nivel básico de la homeostasis, los procesos de activación, regeneración y senescencia influyen en la homeostasis de la proliferación y la muerte celular lo que conduce a la expansión o involución. Por ejemplo, la activación por uso frecuente aumentará el nivel de homeostasis básico a un nivel de homeostasis más alto, tal como un aumento en el volumen y composición muscular a través de entrenamiento físico específico en deportes e involución de tales músculos cuando se suspende el entrenamiento. También el desgaste de la piel por el trabajo duro o exposiciones químicas engrosará la piel de las palmas y las plantas de los pies, callo que desaparecerá cuando el desgaste sea abolido.

Algunas condiciones específicas pueden cambiar o incluso interrumpir el nivel de la homeostasis celular, tales como:

- daño tisular (trauma o intervención quirúrgica) y posterior reparación;
- 50 - el estrés funcional de los sistemas orgánicos, como el abuso del alcohol y la disfunción hepática o la participación en maratón y triatlón y agotamiento muscular;
- involución (prematura) relacionada con la edad (senescencia);
- supresión y posterior regeneración, por ejemplo por fármacos como los corticosteroides;
- inflamación y posterior reparación por regeneración y/o fibrosis, por ejemplo, en enfermedades autoinmunes;
- 55 - enfermedades infecciosas de carácter insolente y persistente, como la tuberculosis, la enfermedad de Lyme, la fiebre Q, etc.

- desregulación de la proliferación, seguida de hiperplasia y potencialmente también seguida de displasia y transformación maligna.

A pesar de altos niveles de proliferación homeostática y apoptosis, las células muertas o las células moribundas se observan raramente en secciones de tejido. Aparentemente, las células muertas y las células apoptóticas son eliminadas rápida y eficientemente por los macrófagos de tejido. Es justo suponer que cada macrófago de tejido individual sirve a un área particular (limitada) en los tejidos implicados y puede eliminar las células apoptóticas y otros daños tisulares de manera eficiente. Dado que cada macrófago tisular probablemente maneja un número limitado de células apoptóticas (por ejemplo, de 20 a 40 células, dependiendo del tamaño y tipo de células), el volumen/tamaño del área de vigilancia depende del tipo de tejido y del nivel de actividad homeostática del tejido afectado. Cuanto mayor sea el nivel de homeostasis o cuanto mayor sea el nivel de reparación o proliferación, más macrófagos tisulares se necesitan para mantener los tejidos involucrados libres de desechos y para evitar alteraciones estructurales del tejido con deterioro funcional del tejido. En consecuencia, el número de macrófagos tisulares por volumen de tejido puede variar dependiendo del tipo de tejido, la actividad del tejido, la aparición de inflamación o reparación después del daño, etc. Tan pronto como los macrófagos tisulares han cumplido su tarea local en su espacio de acción, estos macrófagos en etapa terminal abandonan su sitio de acción y migran a través de los vasos linfáticos al torrente sanguíneo, para ser retirados del cuerpo, probablemente en el bazo.

La vía de diferenciación monocítica en la médula ósea produce continuamente los monocitos CD14alto/CD16-clásico ("monocitos de afluencia de tejidos"), que están disponibles en sangre y pueden ser reclutados como monocitos inflamatorios en los tejidos afectados, donde maduran en una población heterogénea (het) de macrófagos de tejido CD14alto/CD16+ y CD14alto/CD16alto (Figura 1). Tan pronto como estas células han completado sus tareas de vigilancia y fagocitosis, se convierten en macrófagos en fase terminal y migran a través del sistema de vasos linfáticos como CTMs CT14het/CD16het a la corriente sanguínea ("eflujo de tejido" monocitos/macrófagos), donde son frágiles y tienen una vida útil corta (Figura 1).

Al menos en parte, las CTM son detectables en sangre periférica. En sangre normal, una pequeña población de CTM es detectable, teniendo una expresión CD14 y CD16 heterogénea. Estas CTM se incrementan durante el envejecimiento y en condiciones clínicas específicas, por ejemplo, tras el trasplante de células madre (SCT) y en caso de inflamación, sepsis, cáncer y ejercicio excesivo (Figura 2).

El supuesto proceso de migración y recirculación está apoyado por el hallazgo de que las frecuencias relativas de los monocitos clásicos y las CTM difieren por sitio: frecuencias bajas de las CDM heterogéneas CD14+/CD16+ y CTMs CD14dim/CD16alto en la médula ósea y sangre, pero frecuencias más altas en el fluido linfático (Tabla 1) (Orfao et al., resultados no publicados).

Tabla 1. Frecuencias relativas de monocitos clásicos y CTMs *

	Monocitos CD14alto/CD16clásico	CTMs CD14+/CD16+ y CD14dim/CD16alto
Médula ósea	~95%	~5%
Sangre del cordón umbilical	90-95%	5-10%
Sangre de adulto	80-90%	10-20%
Linfa	5-35%	65-95%
*Urfao et al., resultados no publicados		

Es justo suponer que tanto en personas sanas como en condiciones de enfermedad el conjunto de fragmentos de proteína y péptidos en los fagosomas de cada macrófago tisular consiste en péptidos específicos de tejidos, ya que el área de vigilancia de los macrófagos tisulares está muy probablemente limitado a un tipo de tejido, probablemente incluso a una pequeña área de tejido dentro del tejido afectado. En consecuencia, la población total de CTM en sangre en un momento dado refleja el nivel homeostático de todos los tejidos en el cuerpo total. Basándose en el conjunto de péptidos fagosómico, cada CTM individual debe ser asignable a su tejido de origen. La composición relativa de los macrófagos específicos del tejido circulante (CTSM) es probable que sea estable en números relativos y absolutos en la sangre, así como en sus contenidos de diferentes fragmentos de proteínas derivadas de tejidos y péptidos, si bien se producirán dichas diferencias relacionadas con la edad, relacionados con el sexo, relacionadas con el metabolismo y la actividad, ya que influyen en la homeostasis celular. Es importante destacar que los cambios homeostáticos (como el daño tisular) en cualquier sitio del cuerpo conducirán a un cambio en los números relativos y absolutos y en la composición relativa de los niveles intracelulares de fragmentos de proteína y péptidos en la población de macrófagos de tejido en circulación. Tales cambios pueden implicar uno o más subconjuntos distintos de CTM y CTSM y pueden incluir ausencia de un epítipo expresado normalmente, expresión aberrante de un epítipo normalmente ausente o niveles alterados de expresión de un epítipo normalmente

expresado.

En la presente invención se desarrolló un sistema que utiliza una combinación única de marcadores de superficie celular para la detección e identificación de macrófagos de tejido en circulación (CTM) y sus subconjuntos en sangre, que se centra en el reconocimiento de epítomos en productos derivados del procesamiento y degradación intracelular (por ejemplo, una o más proteasas) de proteínas (por ejemplo, péptidos) que se han capturado localmente en el tejido, mediante CTM únicas. La potencia específica del nuevo sistema se refiere a la posibilidad de explorar todo el compartimento CTM en una muestra de sangre para el origen de los subconjuntos de CTM individuales y para definir estos subconjuntos basándose en combinaciones de múltiples fragmentos o péptidos de proteínas específicos de tejido; además, un subconjunto adicional de estos macrófagos específicos de tejido circulante (CTSM) puede estar basado en la expresión de otros péptidos tales como los derivados de proteínas expresadas aberrantemente tales como oncoproteínas. De esta manera, el compartimento CTM total refleja (como espejo) los procesos en curso en los diversos tejidos del cuerpo total, ya sea homeostático o perturbado. Estas mediciones del subconjunto CTM permiten la monitorización del estado de salud y la detección de enfermedades específicas, incluyendo la localización de tejido de estas enfermedades. Tan pronto como se ha realizado el diagnóstico, puede utilizarse la monitorización del subconjunto CTM pertinente para el seguimiento del estado individual a lo largo del tiempo, por ejemplo, para evaluar la desaparición o estabilidad de una enfermedad y/o para evaluar la efectividad del tratamiento.

Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un método para determinar el estado de salud de un sujeto, para la detección temprana de daño tisular, para el diagnóstico y monitorización temprana de una enfermedad y/o para la evaluación de la eficacia del tratamiento en un sujeto usando macrófagos de tejido en circulación (CTM) como un espejo de la homeostasis y la enfermedad del tejido interrumpido, comprendiendo el método las etapas de:

a) tinción de una muestra de ensayo biológica aislada del sujeto, cuya muestra se sabe o se espera que contenga macrófagos de tejido en circulación (CTM) con un panel de anticuerpos distintos diferenciadamente marcados contra los marcadores de armazón CD14, CD16 y CD300e y preferiblemente además HLADR, para la identificación y enumeración de diferentes subconjuntos de CTM;

b) fijación, permeabilización y tinción de la CTM usando uno o más anticuerpos de detección dirigidos contra uno o más epítomos sobre al menos un fragmento proteico inducido por proteasa derivado de la degradación intracelular de una proteína no CTM por CTM individual en sus tejidos de origen, identificando de este modo al menos un subconjunto de macrófagos circulantes específicos de tejidos (CTSM);

c) análisis por citometría de flujo multiparamétrico de dichos CTM y CTSM teñidos por regulación para los marcadores CD14, CD16 y CD300e de armazón para determinar la cantidad de señales de cada anticuerpo marcado distinto asociado con células individuales, en el que el análisis comprende realizar una estrategia de regulación basada en la expresión de la superficie celular de CD300e, CD14 y CD16, en combinación con análisis de dispersión lateral (SSC), y en la que la estrategia de regulación está compuesta por (i) una etapa de inclusión para incluir monocitos clásicos y CTM basados en la expresión de CD300e en combinación con análisis por dispersión lateral(SSC), y (ii) una etapa subsiguiente de identificación de subconjuntos para discriminar los monocitos CD14alto/CD16 clásicos de CTM e identificar subconjuntos dentro de la población CTM;

d) determinar el número relativo y absoluto de células individuales dentro del subconjunto CTM y subconjuntos específicos de CTSM que expresan cada uno de los epítomos intracelulares medidos;

e) calcular (i) el número relativo y absoluto de células dentro del subconjunto CTM y subconjuntos específicos de CTSM, cada uno de los cuales proviene de diferentes tejidos normales y alterados como se define por un conjunto de fragmentos proteicos individuales inducidos por proteasa evaluados, y ii) la cantidad de señal relacionada con el anticuerpo asociada a cada péptido intracelular individual evaluada para obtener un perfil de tinción CTSM de prueba; y

f) comparar el perfil de tinción CTSM de ensayo con un perfil de tinción CTSM normal para cada tejido evaluado, en el que un perfil de tinción de ensayo aberrante es indicativo de daño tisular, alteración de la homeostasis del tejido, presencia de una enfermedad y/o efectividad del tratamiento frente a resistencia.

IREM2 significa "receptor inmune expresado por células mieloides 2". En la nomenclatura de antígenos CD a esta proteína se ha dado la designación CD300E o CD300e. La proteína se conoce también como CD300LE [miembro de la familia de moléculas CD300 LE]. La expresión de IREM2 parece estar restringida a monocitos, macrófagos y células dendríticas y se regula a través de la diferenciación.

El HLADR es un receptor de superficie celular MHC de clase II codificado por el complejo antígeno de leucocitos humanos en la región 6p21.31 del cromosoma 6. HLADR es un heterodímero $\alpha\beta$, receptor de superficie celular, cada subunidad contiene 2 dominios extracelulares, un dominio que abarca la membrana y una cola citoplasmática. Las cadenas α y β están ancladas en la membrana. El complejo de HLADR y su ligando, un péptido de 9 aminoácidos de longitud o más, constituye un ligando para el receptor de células T (TCR).

Como se usa en el presente documento, la abreviatura "CTM" significa los macrófagos de tejido en circulación.

"Subconjuntos CTM" se refiere a diversos subconjuntos de CTM, incluyendo CD14alto/CD16+, CD14alto/CD16alto, CD14+/CD16alto, CD14bajo/CD16alto, CD14-/CD16alto, CTMs CD14-/CD16bajo, CD11c+/CD16+, CD11c+/CD16alto, CT11c+/CD16bajo CTM, CD33alto/CD16+, CD33alto/CD16alto, CD33+/CD16alto, CD33+/CD16bajo, CTM, CD300e+/CD16+, CD300e+/CD16alto, CD300e+/CD16bajo, CTM, CD16+, CD16alto, CD16bajo, CTM, CD14alto/CD16+/CD300e+/HLADR+, CD14alto/CD16alto/CD300e+/HLADR+, CD14+/CD16alto/CD300e+/HLADR+, CD14-/CD16alto/CD300e+/HLADR+ y CD14-/CD16bajo/CD300e+/HLADR+ CTM.

"CTSM" se refiere a los macrófagos específicos de tejido en circulación, para los que la especificidad de tejido se define por tinción intracelular de fragmentos (péptidos) digeridos con proteasa de proteínas específicas de tejido. Los "fragmentos proteicos inducidos por proteasa" son fragmentos o péptidos derivados de proteínas no CTM que han sido ingeridas, procesadas y digeridas por las proteasas en los fagosomas de macrófagos. La expresión "marcadores de la espina dorsal" se refiere a un conjunto recurrente de marcadores para la identificación y enumeración del compartimento CTM y los subconjuntos CTM; en la parte superior de estos marcadores, se pueden utilizar marcadores de membrana adicionales y tinciones intracelulares para la identificación de subconjuntos CTM, en particular los macrófagos específicos de tejido, los denominados subconjuntos CTSM.

De acuerdo con la invención, el conjunto de marcadores vertebrales comprende al menos anticuerpos dirigidos a marcadores CD14, CD16 y CD300e, preferiblemente complementados con HLADR y/o CD45. En una realización, se utiliza la combinación de CD14, CD16 y CD300e. En otra realización, se utiliza la combinación de CD14, CD16, CD300e y HLADR. Preferiblemente, comprende además anticuerpos dirigidos a uno o más de los marcadores CD11c, CD33, CD35, CD36, CD45 y CD64. Se prefieren particularmente los anticuerpos CD45, CD36 y/o CD64. Los paneles de anticuerpos muy útiles comprenden o consisten en anticuerpos contra CD14, CD16, CD300e y CD64; CD14, CD16, HLADR y CD64; CD14, CD16, CD300e, HLADR y CD64; CD14, CD16, CD300e, HLADR y CD45; CD14, CD16, CD300e, HLADR, CD64 y CD36. En un aspecto, la tinción de las CTM se realiza con un panel de anticuerpos distintos marcados diferencialmente contra los marcadores CD14, CD16, CD11c, CD33, CD36, CD45, CD64, CD123, CD86, CD300e y HLA-DR. En un aspecto específico, la tinción de las CTM se realiza con un panel de anticuerpos distintos marcados diferencialmente contra los marcadores CD14, CD16, CD300e, HLADR, CD45, CD64 y CD36. Esto permite una regulación precisa de todos los monocitos y todas las CTMs, discriminación precisa entre monocitos y CTMs, y formación de subconjuntos de CTMs (Figura 3).

El análisis de macrófagos para proteínas ingeridas de origen no macrófago se ha descrito en la técnica. Sin embargo, la ventaja de la subestructura de citometría de flujo de una población diana de macrófagos basada en la selección positiva de células que expresan al menos tres marcadores de superficie específicos (CD14, CD16, CD300e más HLA-DR y/o CD45) de acuerdo con la presente invención nunca ha sido descrito o sugerido.

Japink et al. (Gastroenterology, Elsevier, Vol. 134, No. 4, (2008-04-01), página A-487) divulga la determinación del antígeno carcinoembrionario intracelular (CEA) en células CD14+/CD16+ de muestras de sangre por citometría de flujo para detección temprana o recurrencia de neoplasias colorrectales.

Herwig et al. (European Urology Suppl., Vol. 5, No. 2, (2006-04-01), página 275, XP005522982, y J. of Urology, Vol. 181, No. 4 (2009-04-01), página 653, XP025979386) describe análisis por citometría de flujo multicolor CD14+/CD16+ células mononucleares de sangre periférica para PSA intracelular en el diagnóstico de cáncer de próstata.

El documento WO2010/015633 describe un método para caracterizar marcadores moleculares que son absorbidos intracelularmente desde tejidos por macrófagos sanguíneos que se recirculan desde el tejido hacia el sistema circulatorio. Para ello, se define una población diana CD14/CD16-positiva, opcionalmente en combinación con la selección negativa de células que expresan CD56, CD57 y/o CD161.

El documento WO2009/1000953 se refiere al análisis de macrófagos activados (CD14/CD16) para fragmentos intracelulares de fragmentos A beta. Los fragmentos A beta son detectados por MALDI-TOF-MS después de la lisis celular para generar un lisado celular combinado e inmunoprecipitación. Se utiliza una combinación de anticuerpos contra CD45, CD14, CD16 y CD19 para identificar macrófagos activados y la población de células B.

Almeida et al. (Clin. Immunol. Vol. 100, No. 3, páginas 325-338, 2001) realizó un análisis comparativo de las características morfológicas, citoquímicas, inmunofenotípicas y funcionales del linaje de sangre periférica humana normal (-)/CD16(+)/células HLA-DR(+)/CD14(bajas), monocitos CD14(+) y células dendríticas CD16(-). Se describe la clasificación celular de células mononucleares usando una combinación de anticuerpos contra CD14, CD16 y HLADR, más otros marcadores específicos de linaje (por ejemplo CD3 para exclusión de linfocitos T, CD19 para excluir células B y CD56 para excluir células NK). Las células clasificadas se analizan posteriormente mediante examen morfológico y citoquímico de las características específicas de los monocitos. No se menciona ni se sugiere nada acerca de la tinción intracelular para proteínas procesadas, específicas de tejido.

El método de citometría de flujo multicolor proporcionado en la presente invención comprende estrategias de regulación específicas basadas en la expresión de la superficie celular de CD14, CD16 y CD300e(IREM2), preferiblemente CD14, CD16, CD16, CD300e(IREM2) y HLADR, en combinación con análisis por dispersión lateral

(SSC) (Figura 4). la que la expresión de CD14, CD16 y CD300e(IREM2) (Figura 4). Las estrategias de regulación para las poblaciones de células monocito-macrófagos están compuestas por una etapa de inclusión y una etapa de identificación de subconjuntos. El paso de inclusión apunta a la inclusión tanto de los "monocitos clásicos" ("monocitos de flujo de tejidos") como de los macrófagos de tejido (monocitos/macrófagos de "eflujo de tejido" = macrófagos del tejido circulante; CTM). Las etapas posteriores deberían discriminar los monocitos clásicos de las CTM y deberían identificar particularmente subconjuntos dentro de la población CTM. Por lo tanto, la estrategia de regulación comprende (i) una estrategia de inclusión regulación para incluir monocitos clásicos y CTMs basados en la expresión de CD300e en combinación con análisis de dispersión lateral (SSC), seguido por (ii) una estrategia de regulación de identificación de subconjuntos para discriminar clásicos CD14alto/CD16- monocitos a partir de CTM e identificar uno o más subconjuntos dentro de la población de CTM; (iii) un paso subsiguiente de identificación de subconjuntos para discriminar los monocitos clásicos de CTM e identificar subconjuntos dentro de la población de CTM;

Se pueden prever diversas estrategias de regulación. La estrategia más sencilla para la detección de todos los monocitos clásicos y la gran mayoría de CTM y algunos subconjuntos CTM comprende tinción con al menos CD14, CD16 y CD300e. Todos los monocitos clásicos y la mayoría de las CTM (no todas) se detectan regulando una combinación de células de dispersión lateral (SSC) más células CD300e(IREM2)+ (células selectas con SSC bajo a intermedio que expresan CD300e). Una estrategia más precisa para la detección de todos los monocitos clásicos y virtualmente todos los CTM y algunos subconjuntos CTM comprende tinción con al menos CD14, CD16, CD300e y HLADR. Todos los monocitos clásicos más virtualmente todos los CTMs se detectan por regulación sobre una combinación de dispersión lateral (SSC) más CD300e y HLADR (es decir, seleccionar células con SSC bajo a intermedio que simultáneamente coexpresan CD300e y HLADR). Una estrategia altamente precisa para la detección de todos los monocitos clásicos y de todos los CTM y algunos subconjuntos CTM comprende tinción con al menos CD14, CD16, CD45, CD300e y HLADR. Toda la afluencia y todos los monocitos/macrófagos de eflujo pueden ser detectados por regulación en una combinación de dispersión lateral (SSC) más células CD45, CD300e y HLADR positivas. Más específicamente, se seleccionan células con CD45 y SSC de bajo a intermedio que simultáneamente expresan CD300e y HLADR (Figura 4A y B). Por consiguiente, la etapa de inclusión puede comprender uno de los siguientes:

(i) tinción con al menos CD14, CD16 y CD300e y regulación sobre una combinación de células SSC más CD300e+ para seleccionar células con SSC de bajo a intermedio que expresan CD300e;

(ii) tinción con al menos CD14, CD16, CD300e y HLADR y regulación sobre una combinación de dispersión lateral (SSC) más células CD300e y HLADR+ para seleccionar células con SSC de bajo a intermedio que simultáneamente coexpresan CD300e y HLADR; o

(iii) tinción con al menos CD14, CD16, CD45, CD300e y HLADR

y regulación sobre una combinación de células SSC más CD45, CD300e y HLADR positivas, preferiblemente bloqueando células con CD45 y SSC bajo a intermedio que simultáneamente coexpresan CD300e y HLADR (Figura 4A a D).

La invención también proporciona varias estrategias de regulación para la identificación de subconjuntos CTM. La estrategia permite la identificación de monocitos clásicos (CD14+/CD16-) y algunos subconjuntos CTM. Los subconjuntos CTM se definen dentro de una de las regulaciones de inclusión anteriores, utilizando preferiblemente al menos SSC, CD300e y HLADR, basándose en el uso adicional de al menos CD14 y CD16. Por consiguiente, en una realización la estrategia de regulación comprende la identificación de monocitos clásicos (CD14+/CD16-) y dos subconjuntos CTM principales identificados como CD14alto/CD16bajo a CD14alto/CD16alto, y CD14bajo/CD16alto a CD14-/CD16alto y CD14-/CD16bajo (Figura 4D).

En otra realización, la estrategia de regulación de subconjuntos consiste en tres etapas, que permiten una detección más precisa de monocitos clásicos y varios subconjuntos CTM dentro de una de las regulaciones de inclusión anteriores (preferiblemente utilizando al menos SSC, CD300e y HLADR), basándose en el uso adicional de al menos CD14, CD16 y CD64.

En la primera etapa, los monocitos clásicos y los estadios CTM más maduros están siendo identificados por regulación en CD64bajo (CTM de fase tardía) frente a CD64alto (monocitos clásicos más CTM de etapa temprana). El segundo paso apunta a la discriminación entre monocitos y CTM por selección para todas las demás células CTM tempranas (frente a monocitos clásicos) como aquellos eventos que llevan un fenotipo CD16+/CD14+. En consecuencia, las células seleccionadas, definidas como CD64bajo y como CD16+/CD64alto constituirían el compartimento CTM completo, mientras que todas las demás células reguladas seleccionadas en la etapa general de regulación corresponderían a monocitos clásicos. En la tercera etapa, basada en los niveles de expresión de CD64, CD14 y CD16 entre la CTM seleccionada pueden subdividirse adicionalmente en compartimentos funcionales o de maduración distintos asociados: desde CD64alto/CD14alto/CD16bajo a CD64alto/CD14alto/CD16alto, CD64alto/CD14bajo/CD16alto, CD64bajo/CD14-/CD16alto y CD64bajo/CD14-/CD16bajo. Por consiguiente, en un aspecto la etapa de identificación del subconjunto comprende:

- regulación en CD64bajo que representa la etapa tardía CTM versus CD64alto que representan CTM de monocitos clásicos de etapa más temprana, seguido por

5 - discriminación entre monocitos y CTM por selección para todas las demás células CTM tempranas (frente a monocitos clásicos) como aquellos eventos que llevan un fenotipo CD16+/CD14+ y definición del compartimento CTM completo como CD64bajo y como CD16+/CD64alto, seguido por

- subdividir adicionalmente el CTM seleccionado con base en los niveles de expresión de CD64, CD14 y CD16 en compartimentos funcionales o asociados a maduración distintos, preferiblemente en los que los compartimentos distintos son CD64alto/CD14alto/CD16bajo a CD64alto/CD14alto/CD16alto, CD64alto/CD14bajo/CD16alto, CD64bajo/CD14-/CD16alto y CD64bajo/CD14-/CD16bajo.

10 Todavía en una realización adicional, la invención proporciona una estrategia que permite la formación de subconjuntos adicionales de la población CTM, lo que podría ser valioso en el caso de muestras específicas (por ejemplo, sangre periférica infantil o médula ósea de adultos) que contienen precursores de monocitos clásicos. El uso de CD36 en combinación con CD64 contribuye a identificar mejor todas las etapas de maduración de los monocitos clásicos y CTM en el tercer paso de la estrategia anterior con las siguientes subpoblaciones (Figura 4E a H):

15 - Monocitos clásicos: CD64alto/CD36lo (precursores de monocitos clásicos) a células CD64alto/CD36alto (monocitos maduros reales);

20 - Subconjuntos CTM: de CD64alto/CD36alto/CD14alto/CD16bajo a CD64alto/CD36alto/CD14alto/CD16alto, CD64alto/CD36alto/CD14bajo/CD16alto y CD64bajo/CD36alto/CD14-/CD16alto a CD64bajo/CD14-/CD16bajo/CD36- a celdas bajas.

25 A continuación, se proporciona también un procedimiento que comprende la etapa de subdividir adicionalmente la CTM seleccionada basada en CD14, CD16, CD36 y CD64, que comprende preferentemente la identificación de al menos uno de los siguientes subconjuntos CTM: desde CD64alto/CD36alto/CD14alto/CD16bajo hasta CD64alto/CD36alto/CD14alto/CD16alto, CD64alto/CD36alto/CD14bajo/CD16alto, CD64bajo/CD36alto/CD14-/CD16alto y CD64bajo/CD14-/CD16bajo/CD36- a las células bajas (Figura 4 y Figura 5).

30 Se puede usar cualquier tipo de muestra biológica aislada de un sujeto mamífero, típicamente un sujeto humano, conocido o sospechoso de contener macrófagos de tejido en circulación. Por ejemplo, la muestra de ensayo biológico comprende sangre periférica, fluido ascítico, derrame pleural, fluido cefalorraquídeo, médula ósea, ganglio linfático, fluido linfático, fluido sinovial o una suspensión de una sola célula preparada a partir de un tejido sólido. La sangre periférica es particularmente adecuada, ya que puede obtenerse fácilmente de un sujeto mediante un procedimiento mínimamente invasivo, tal como la venipuntura.

35 Un procedimiento de la invención se realiza ventajosamente en un formato de múltiples tubos, que ofrece la posibilidad de combinar información sobre subconjuntos CTSM. Esto se basa en la suposición justa de que, en condiciones homeostáticas normales, cada CTSM individual puede ser positivo para péptidos (fragmentos de proteína) a partir de un único tejido. Por lo tanto, también se proporciona un método en el que dos o más alícuotas de la misma muestra biológica de ensayo se tiñen en paralelo con los mismos marcadores de la armazón para la identificación de subconjuntos de CTM, pero con diferentes reactivos de anticuerpos adicionales para subconjuntos más detallados de poblaciones CTSM individuales, basados en la detección de fragmentos proteicos inducidos por proteasa derivados de proteínas asociadas a tejidos, con el objetivo de escanear el estado homeostático y la posible alteración de la homeostasis tisular en los tejidos del cuerpo total.

40 Herwig et al. (2004, 2005, EP1516182) y Leers et al. (2008) revelaron la detección en pacientes con cáncer de próstata de la presencia de macrófagos de tejido circulante CD14het/CD16het, que afirman contener antígeno específico de próstata intracelular (PSA). Leers et al. (2008) concluyen que en pacientes con hiperplasia benigna versus cáncer de próstata localizado versus cáncer de próstata en metástasis, la frecuencia de los macrófagos de tejido PSA positivo en la sangre se incrementa progresivamente (Leers y col., Am J Clin Pathol 2008). Sin embargo, sus datos de citometría de flujo presentados parecen contener resultados falsos positivos con respecto a la tinción con PSA:

45 - las células PSA positivas no son detectables como una población separada, que no sea un corte de la población de CTM mediante el establecimiento de un marcador "controlado";

50 - la alta frecuencia de macrófagos aparentemente PSA-positivos de tejidos de alto CD14dim/CD16alto está en una posición inusual tanto en el diagrama de dispersión de luz como en el gráfico de CD14 frente a CD16, indicativo de la formación de dobletes y, en consecuencia, falsa positividad potencial para PSA.

55 Por lo tanto, aunque la frecuencia aumentada de CTM bien podría derivarse de la próstata, la prueba final a través de la tinción con PSA no es convincente. Esto es más probable causado por la insuficiente reactividad del anticuerpo anti-PSA aplicado contra los péptidos de PSA presentes en la población de CTSM. En este contexto, debe observarse que el anticuerpo PSA aplicado se seleccionó para reconocer la proteína PSA intacta, en lugar de

epítomos sobre fragmentos o péptidos derivados del procesamiento intracelular y degradación de PSA. En consecuencia, el epítomo original de PSA reconocido por el anticuerpo PSA se pierde muy probablemente en los péptidos PSA que estaban presentes en los CTSM, y por lo tanto no detectables.

5 Las estrategias de regulación por Herwig et al. (European Urology Suppl., Vol. 5, No. 2, (2006-04-01), página 275, XP005522982, y J. of Urology, Vol. 181, No. 4 (2009-04-01), página 653, XP025979386), Leers et al. (2008), Brozek (WO2010/015633), y Japink et al. (Gastroenterology, Elsevier, Vol. 134, No. 4, (2008-04-01), página A-487) no son suficientes para incluir todas las CTM y no son suficientes para la exclusión de todas las no CTMs. Esto es causado principalmente por el hecho de que los científicos anteriores han elegido para inclusión regulación basado sólo en SSC y CD45 o selección negativa basada en CD19, CD56, CD57 y/o CD161, sin confirmación de la exclusión apropiada de multipletes celulares. Tales estrategias conducen a falsos resultados positivos y también pueden conducir a falsos resultados negativos.

10 En contraste con el trabajo anterior de otros (Herwig et al., Leers et al., y Japink et al.) y nuestro propio grupo, aquí se propone un procedimiento para la identificación de todos los subconjuntos distintos de monocitos clásicos y CTM basados en una selección de marcador positivo adicional (células CD300e+ y preferiblemente también HLADR+), sin necesidad de exclusión de otras células tales como linfocitos T, NK y B. Tal procedimiento, permite una fácil exclusión directa de los linfocitos CD300e-, al mismo tiempo que facilita la identificación de CTM de CD14-/CD16bajo de fase tardía que normalmente se excluyen si la selección de CTM se basa exclusivamente en células CD14+ y/o CD16+ (Figura 4 y Figura 5).

15 Un kit de CTM de diagnóstico sin los marcadores de inclusión presentados en la presente memoria descriptiva y marcadores de subconjunto de CTM no se puede aplicar de manera fiable en la práctica de diagnóstico de rutina, donde se requiere una cuantificación relativa exacta y absoluta de las poblaciones de células.

20 La etapa c) de un método proporcionado aquí implica la identificación de al menos un subconjunto de macrófagos específicos de tejido circulante (CTSM) usando uno o más anticuerpos de detección dirigidos contra uno o más epítomos sobre al menos un fragmento de proteína inducido por proteasa derivado de la degradación intracelular de una proteína por CTM individual en sus tejidos de origen. El experto entenderá que de acuerdo con el concepto subyacente a la invención se pueden emprender diversos procedimientos. Por ejemplo, los reactivos de anticuerpo de detección comprenden anticuerpos para la tinción intracelular de (Figura 6):

- 25 a) uno o más epítomos de un único fragmento proteico inducido por proteasa derivado de una proteína asociada a tejidos tratada intracelularmente;
- 30 b) uno o más epítomos de dos o más fragmentos distintos de proteína inducidos por proteasa derivados de una proteína asociada al tejido procesada intracelularmente;
- c) uno o más epítomos de dos o más fragmentos distintos de proteínas inducidos por proteasa derivados de dos o más proteínas procesadas intracelularmente derivadas de células normales de un único órgano o tejido;
- 35 d) uno o más epítomos de dos o más fragmentos distintos de proteínas inducidos por proteasa derivados de dos o más proteínas procesadas intracelularmente derivadas de células anormales de un único órgano o tejido;
- e) uno o más epítomos de dos o más fragmentos distintos de proteínas inducidos por proteasa derivados de dos o más proteínas procesadas intracelularmente derivadas de células normales y anormales de un solo órgano o tejido, incluyendo una combinación de al menos un anticuerpo contra epítomos peptídicos de una proteína normal y al menos un anticuerpo contra epítomos peptídicos de una proteína aberrante, y;
- 40 f) uno o más epítomos de dos o más fragmentos distintos de proteínas inducidos por proteasa derivados de dos o más proteínas procesadas intracelularmente derivadas de células normales o anormales de dos o más órganos o tejidos.

45 En una realización, el panel de reactivos de armazón utilizados para el subconjunto de CTM se combina con uno o múltiples reactivos dirigidos contra uno o más epítomos de dos o más fragmentos de proteínas inducidos por proteasa distintos derivados de dos o más proteínas procesadas intracelularmente derivadas de células normales o anormales de dos o más órganos o tejidos. El panel de reactivos utilizado para el subconjunto de CTM puede combinarse con uno o múltiples reactivos dirigidos contra uno o más epítomos de dos o más fragmentos de proteínas inducidos por proteasa distintos derivados de dos o más proteínas procesadas intracelularmente a partir de células normales y anormales de dos o más diferentes órganos o tejidos, incluyendo una combinación de al menos dos reactivos dirigidos cada uno contra epítomos peptídicos de diferentes proteínas derivadas de órganos o tejidos distintos, en donde al menos uno es un tejido alterado.

50 En una realización, el al menos un anticuerpo de detección permite la detección de uno o más epítomos peptídicos derivados de una proteína aberrante, preferiblemente en la que la proteína aberrante se selecciona del grupo que consiste en proteínas oncogénicas, proteínas mutadas, proteínas de fusión, proteínas derivadas de un alérgeno y
55 proteínas derivadas de un patógeno como un virus, una bacteria, un parásito o un hongo.

De acuerdo con las proteasas presentes en los macrófagos y las proteínas específicas del tejido y de la enfermedad, será posible predecir (al menos en parte) qué péptidos estarán presentes en los fagosomas de cada subconjunto CTSM. El desarrollo de anticuerpos contra los fragmentos o péptidos de proteínas específicos de tejidos permitirá la caracterización detallada de los macrófagos del tejido circulante y la identificación de múltiples subconjuntos de diferentes CTSM. Una vez que se ha evaluado la composición del compartimento CTM y CTSM total, será posible detectar e identificar cambios en el tamaño y composición relativa de las poblaciones CTM y CTSM en relación con cambios en, por ejemplo, homeostasis de tejidos, asociada con el envejecimiento, estrés tisular, enfermedades específicas o terapias.

De esta manera, la disección del tamaño y composición del compartimento CTM-CTSM proporciona un espejo de homeostasis tisular y cualquier alteración de la homeostasis tisular. Por lo tanto, el análisis por citometría de flujo de los subconjuntos CTSM proporciona una herramienta de diagnóstico para la evaluación de la integridad de los tejidos y/o interrupción del tejido. Por lo tanto, la citometría de flujo CTSM subconjunto de cribado se convierte en un método sensible para el cuerpo total de escaneo, el llamado "Flow Cytometric Body Scanning" (FlowBoScan) o "Tissue Macrophage Scan" (TiMaScan).

El FlowBoScan o TiMaScan es muy probable que sea más sensible que las tomografías computarizadas clásicas u otros escáneres y sistemas de imágenes corporales, ya que el compartimento CTSM proporciona un escáner corporal ampliado a través de la recolección de "células de apoptosis y células muertas" de todos los tejidos concentrados por lo tanto, la exploración basada en CTSM como la descrita en la presente memoria será por lo tanto capaz de detectar daño o enfermedades en el tejido en una etapa temprana, tanto cuando los defectos se distribuyen difusamente a bajo nivel y cuando están presentes como pequeños defectos focales. Además, tan pronto como se ha realizado el diagnóstico y se ha iniciado el tratamiento, se puede monitorizar el subconjunto CTSM pertinente para obtener información sobre la efectividad de la terapia, es decir, la desaparición (o no) de los CTSM relacionados con el proceso de la enfermedad.

Paralelamente a la monitorización de la eficacia del tratamiento, también se puede monitorizar la toxicidad de la terapia proporcionada analizando subconjuntos de CTSM derivados de otros tejidos, que también son más propensos a ser dirigidos por la terapia como un efecto secundario no deseado, por ejemplo, toxicidad asociada a las células hematopoyéticas de los fármacos citotóxicos. En consecuencia, incluso podría ser posible guiar la intensidad de la terapia de acuerdo con los resultados combinados de CTSM. Esta forma de medicina individualizada es cada vez más importante para prevenir secuelas tardías y por lo tanto aumentar la calidad de vida (Allison, Nature Biotechnol 2008).

La medición propuesta de la interrupción en la homeostasis de los tejidos en un método de acuerdo con la invención puede parecer, a primera vista, similar a la medición de proteínas séricas. Sin embargo, sólo puede detectarse una parte de las proteínas tisulares en el suero (por ejemplo, transaminasas hepáticas, PSA y otras serina proteasas de la familia de la calicreína, o mioglobina). Además, sólo en caso de daño tisular sustancial, como en infarto cardíaco o daño hepático, estas proteínas séricas muestran niveles aumentados. Otras proteínas tisulares no son fácilmente detectables en el suero, en consonancia con los mecanismos fisiológicos que ocultan los autoantígenos de la vigilancia inmune a través de proteínas transportadoras especializadas, la proteína C reactiva (CRP) y otras proteínas plasmáticas y mediante la destrucción de proteínas tisulares por proteasas celulares locales y células inflamatorias o fagocíticas (por ejemplo, macrófagos tisulares). Finalmente, las proteínas específicas de tejido liberadas se diluyen en un gran volumen de fluidos tisulares (por ejemplo, linfa) y suero en todo el cuerpo que típicamente alcanza concentraciones indetectables en homeostasis normal y etapas tempranas de alteración de la homeostasis normal.

El sistema aquí descrito para la detección e identificación de subconjuntos CTSM se centra en la detección de epítomos en fragmentos derivados de proteínas procesadas intracelularmente y digeridas (por ejemplo, péptidos) en células CTSM individuales. El sistema se denomina "FlowBoScan" o "TiMaScan", que es una exploración de cuerpo por citometría de flujo mediante la evaluación de la frecuencia relativa y absoluta de CTMs y subconjuntos CTM y subconjuntos específicos de tejido de estos CTMs, siendo los subconjuntos CTSM_s y CTSM.

La potencia específica del sistema descrito se refiere a la posibilidad de examinar todo el compartimento CTSM en una muestra de sangre para el origen de los subconjuntos CTSM individuales y definir estos subconjuntos basándose en combinaciones de múltiples fragmentos derivados de proteínas específicas de tejido (péptidos), incluyendo las derivadas de proteínas expresadas aberrantemente o asociadas a enfermedades tales como oncoproteínas, proteínas de fusión, proteínas derivadas de alérgenos y proteínas derivadas de microorganismos. De esta manera, el compartimento CTSM total refleja (como espejo) los procesos en curso en los diversos tejidos del cuerpo total, ya sea homeostático o perturbado.

Las células diana en sangre incluyen macrófagos de tejido CD16+ (por ejemplo CD14het/CD16het CTM) así como monocitos CD14+/CD16- y diferentes poblaciones de células dendríticas circulantes tales como mieloides (CD11c+/CD14-/CD16-/HLADR+) y plasmacitoides (CD11c-/CD123+/CD14-/CD16-/HLADR+), y precursores de células dendríticas. CTSM derivados de diferentes órganos y tejidos circulan a través del sistema de los vasos linfáticos y la sangre en condiciones fisiológicas normales. Así, además de estar presentes en la sangre, también pueden encontrarse en sus tejidos de origen así como en otros fluidos corporales asociados tales como fluido

ascítico, derrames pleurales, drenaje linfático en los ganglios linfáticos locales o regionales, entre otros. En esta invención, principalmente (pero no exclusivamente) se centran en el compartimiento CTSM en la sangre.

5 Para la identificación y enumeración de CTSM en sangre, se utiliza adecuadamente una citometría de flujo multiparamétrica. El procedimiento de citometría de flujo tendrá como objetivo la identificación simultánea de la población total de CTM en muestras de sangre y su caracterización a nivel de célula única con respecto a la presencia intracelular de uno o más epítomos de uno o múltiples fragmentos o péptidos de tejido y/o proteínas asociadas a la enfermedad procesadas por los macrófagos tisulares en uno o varios órganos y tejidos (identificación de subconjuntos CTSM).

10 Para este propósito, se tiñe una muestra de sangre con una combinación de dos grupos de marcadores de anticuerpo marcados diferencialmente (véase la Tabla 2):

1. Un primer conjunto de marcadores (de espina dorsal) destinados a la identificación y enumeración de diferentes subconjuntos de CTM;

15 2. Un segundo grupo de marcadores dedicados a la detección intracelular simultánea de uno o más epítomos sobre fragmentos proteicos o péptidos derivados de la degradación de una o más proteínas procesadas por CTM individuales en sus tejidos de origen.

Los anticuerpos se proporcionan con un marcador detectable que permite su detección y cuantificación separadas. Se conocen marcadores detectables (por ejemplo fluorocromo) en la técnica.

20 Por ejemplo, el panel de reactivos de anticuerpo marcados diferencialmente comprende una combinación de fluorocromos compatibles seleccionados entre isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína de clorofila peridina (PerCP), alofococianina (APC), alexa flúor 488, alexa 647, alexa 710, alexa flúor 405, cianina 5 (Cy5), cianina 5.5 (Cy5.5), azul pacífico (PacB), violeta brillante (por ejemplo BV421), violeta de horizonte 450 (HV450), pacífico naranja (PacO), HV500, Krome Orange, OC515, puntos cuánticos y conjugados de los mismos acoplados con PE, a APC o a PerCP (por ejemplo, PE/Cy5, PE/Cy5.5, PE/Cy7, PerCP/Cy5.5, APC/Cy7, PE-Texas Red), APCCy750, o cualquier tándem fluorocromo o fluorocromo compatible adicional.

25 En otra realización, el panel de reactivos de anticuerpo marcados diferencialmente comprende una combinación de radioisótopos compatibles.

Tabla 2. Procedimiento ejemplar para la preparación de muestras y tinción multicolor de CTMs y CTSMs

Procedimiento A. Tinción de marcadores de superficie celular de CTMs y CTSMs

30 1. Añada el volumen adecuado de anticuerpos dirigidos contra los marcadores de superficie celular, como se recomienda para cada panel de anticuerpos CTM o CTSM específico.

2. Si es necesario, use PBS + 0.5% de BSA para alcanzar un volumen final de 100 µL por tubo.

3. Mezclar bien.

4. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (RT) protegido de la luz.

35 5. Añadir 2 mL de 1x FACS Lysing Solution (10x FACS Lysing Solution diluido 1/10 vol/vol en agua destilada (dH₂O), Becton Dickinson, San José, CA).

6. Mezclar bien.

7. Incubar durante 10 minutos a RT protegido de la luz.

8. Centrifugar durante 5 min a 540 g.

40 9. Desechar el sobrenadante usando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin alterar el sedimento celular, dejando aproximadamente 50 µL de volumen residual en cada tubo.

10. Añadir 2 mL de PBS + 0.5% de BSA al sedimento celular.

11. Mezclar bien.

12. Centrifugar durante 5 minutos a 540 g.

45 13. Desechar el sobrenadante usando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin perturbar el sedimento celular, dejando aproximadamente 50 µL de volumen residual en cada tubo.

14. Resuspender el sedimento celular en 200 µL de PBS + 0.5% de BSA.

15. Adquirir las células después de la tinción o (si no se adquiere inmediatamente) almacenar a 4°C máximo durante 3 horas hasta que se mida en el citómetro de flujo multicolor

Procedimiento B. Tinción combinada de membrana de superficie celular y marcadores intracelulares de CTMs y CTSMs

- 5 16. Continuación del procedimiento A etapa 13.
17. Añadir los volúmenes adecuados de anticuerpos, como se recomienda para cada panel de anticuerpos CTM o CTSM específico.
18. Si es necesario, usar PBS + BSA al 0.5% para alcanzar un volumen de 100 µL por tubo.
19. Mezclar bien.
- 10 20. Incubar durante 15 minutos a RT protegido de la luz.
21. Añadir 2 mL de PBS + 0.5% de BSA al sedimento celular.
22. Mezclar bien.
23. Centrifugar durante 5 minutos a 540 g.
- 15 24. Desechar el sobrenadante usando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin alterar el sedimento celular, dejando aproximadamente 50 L de volumen residual en cada tubo.
25. Resuspender la pella celular mezclándola suavemente.
26. Añadir 100 µL de Reactivo A (fijador; Fix&Perm™, An der Grub, Viena, Austria)*
27. Incubar durante 15 minutos a RT protegido de la luz.
28. Añadir 2 mL de PBS + 0.5% de BSA al sedimento celular.
- 20 29. Mezclar bien.
30. Centrifugar durante 5 minutos a 540 g.
31. Desechar el sobrenadante usando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin alterar el sedimento celular, dejando aproximadamente 50 µL de volumen residual en cada tubo.
32. Resuspender la pella celular mezclándola suavemente.
- 25 33. Añadir 100 µL de Reactivo B (solución permeabilizante, Fix&Perm™)*
34. Mezclar bien.
35. Añadir el volumen apropiado de los anticuerpos contra los péptidos intracelulares (fragmentos de proteína).
36. Mezclar bien.
37. Incubar durante 15 minutos a RT protegido de la luz.
- 30 38. Añadir 2 mL de PBS + 0.5% de BSA al sedimento celular.
39. Mezclar bien.
40. Centrifugar durante 5 minutos a 540 g.
41. Desechar el sobrenadante usando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin molestar el sedimento celular, dejando aproximadamente 50 µL de volumen residual en cada tubo.
- 35 42. Resuspender el sedimento celular en 200 µL de PBS + 0.5% de BSA.
43. Adquirir las células después de la tinción o (si no se adquiere inmediatamente) almacenar a 4°C al máximo durante 3 horas hasta que se mida en el citómetro de flujo multicolor.

*También se pueden usar otros métodos para fijación y permeabilización, por ejemplo solución de Lysing FACS

- 40 Se requiere un mínimo de 3, preferiblemente 4, marcadores de armazón para la identificación de los CTM. Este conjunto de marcadores de armazón contiene al menos CD14, CD16 y CD300e y preferiblemente también HLADR. Otros marcadores útiles incluyen antígenos de leucocitos CD11c, CD33, CD36, CD45 y/o CD64 (por ejemplo

CD14/CD16, CD11c/CD16, CD33/CD16, CD64/CD16, CD11c/CD14/CD16, CD33/CD14/CD16, CD33/CD11c/CD16, CD300e/CD14/CD16, CD300e/HLADR/CD14/CD16, CD300e/HLADR/CD64/CD16/CD14, CD300e/CD11c/CD16/CD64, CD300e/HLADR/CD64/CD36/CD16/CD14 o combinaciones de marcadores de estos marcadores a las que se añade CD45). En general, las diferencias sutiles en la expresión de un solo marcador de superficie celular (o incluso dos marcadores) no siempre pueden ser suficientes para el reconocimiento preciso de todos los CTM y subconjuntos de CTM (Figura 2C), pero cuando el perfil general de múltiples marcadores se evalúa por análisis multivariante como el análisis de componentes principales (PCA), por ejemplo utilizando la separación de la población automatizada -APS vista- en el software de Infinicyt, o análisis de escala multidimensional (MDS) los CTM y CTM subconjuntos pueden ser identificados con mayor precisión (Figura 3). En el ejemplo mostrado en la Figura 3, en las vistas APS1 y APS2 se visualizan representaciones bidimensionales de los componentes principales primero y segundo y de los componentes principales tercero y cuarto frente a las células CD14^{het}/CD16^{het} teñidas para CD14, CD16 y otros marcadores de armazón múltiples. Las combinaciones más potentes de parámetros para discriminar entre los monocitos clásicos y los CTM se utilizan por valor decreciente en los componentes principales 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

Por lo tanto, la invención también proporciona un método para determinar el estado de salud de un sujeto, para la detección temprana de daño tisular, para el diagnóstico precoz y el control de una enfermedad, y/o para la evaluación de la eficacia del tratamiento en un sujeto usando macrófagos de tejido en circulación (CTM) como un espejo de homeostasis y enfermedad de tejido interrumpido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el análisis citométrico de flujo multiparamétrico de dicha CTM teñida para determinar la cantidad de señales de cada anticuerpo marcado distinto asociado con células individuales implica análisis multivariante, preferiblemente análisis de componente principal (PCA), por ejemplo utilizando la separación automatizada de población -APS vista- en el software de Infinicyt, o el análisis de escala multidimensional (MDS) (Figuras 4 y 5).

El PCA es un procedimiento matemático que utiliza una transformación ortogonal para convertir un conjunto de observaciones de variables posiblemente correlacionadas en un conjunto de valores de variables no correlacionadas denominadas componentes principales. El número de componentes principales es menor o igual que el número de variables originales. Esta transformación se define de tal manera que el primer componente principal tiene una varianza tan alta como sea posible (es decir, explica la mayor parte de la variabilidad en los datos como sea posible), y cada componente sucesivo a su vez tiene la varianza más alta posible bajo la restricción de que sea ortogonal a (no correlacionado con) los componentes anteriores. Se garantiza que los componentes principales sólo son independientes si el conjunto de datos se distribuye conjuntamente de forma normal. El PCA es sensible a la escala relativa de las variables originales. Dependiendo del campo de aplicación, también se denomina la transformación discreta de Karhunen-Loève (KLT), la transformación de Hotelling o descomposición ortogonal apropiada (POD). Alternativamente a PCA, puede usarse MDS o cualquier otro tipo de análisis multivariado bien establecido.

En una realización preferida, la evaluación de las tinciones descritas anteriormente comprende citometría de flujo de ≥ 4 colores y, en la realización más preferida, enfoques de citometría de flujo de ≥ 5 colores, en la que ≥ 1 de los marcadores usados (colores) corresponde a marcadores que identifican epítomos intracelulares sobre fragmentos o péptidos derivados de la degradación de una o múltiples proteínas asociadas a tejidos y/o enfermedades que habían sido capturadas localmente en su tejido de origen y procesadas por la CTM y donde los otros marcadores son marcadores de armazón, respectivamente.

Además de los marcadores de armazón enumerados anteriormente, se pueden usar otros marcadores para la exclusión específica de otras poblaciones de células no CTM, por ejemplo, se pueden usar CD15 y/o CD24 para excluir neutrófilos, CD56 y/o CD7 para excluir células NK, CD3 para linfocitos T, CD19 y/o CD20 para células B y CD123 para células dendríticas plasmacitoides.

La tinción de CTM y otras poblaciones celulares en la muestra incluye tinción tanto para marcadores de membrana de superficie celular como marcadores intracelulares usando técnicas de inmunofluorescencia directa convencionales combinadas con diferentes procedimientos de fijación celular, permeabilización celular y lisis de eritrocitos y reactivos (véase Tabla 2).

Es de destacar, que para una muestra de sangre periférica individual, el número de fragmentos de proteína o epítomos peptídicos de una o múltiples proteínas asociadas a tejidos y/o enfermedades procesadas por la CTM podría ser mayor que el que se permite medir en combinación con los seleccionados, debido a las limitadas capacidades analíticas multicolor del citómetro de flujo utilizado. En tal caso, se requieren múltiples alícuotas de la misma muestra de sangre periférica, que se tiñen cada una para el mismo conjunto de marcadores de armazón y para un panel de epítomos diferente (parcialmente solapado o no) de uno o múltiples tejidos y/o proteínas asociadas procesadas por las CTM.

Después de medirse en el citómetro de flujo utilizando procedimientos convencionales de adquisición de datos, en este caso se utilizan ventajosamente las herramientas de fusión y cálculo del software Infinicyt (Cytognos SL, Salamanca, España) para crear un único archivo de datos que contiene todos los fragmentos de proteína-asociadas a las células individuales contenidas en las poblaciones de CTM presentes en la muestra. Para la identificación de las células CTM y sus (sub)poblaciones de interés, pueden utilizarse estrategias multidimensionales como las

implementadas en el software Infinicyt, basadas en regulación Booleanas secuencial, análisis de componentes principales y escala multidimensional, sobre la base de marcadores de la armazón y los marcadores de caracterización, respectivamente. En este documento se describen anteriormente estrategias de regulación útiles.

5 Además, pueden usarse en paralelo procedimientos convencionales para evaluar conteos de células absolutos de la población CTM total y sus distintas subpoblaciones identificadas por unidad de volumen de muestra, para calcular el número exacto de células por unidad de volumen de muestra. Tales procedimientos pueden usar enfoques volumétricos o perlas de referencia internas comercialmente disponibles, tales como cuentas TrueCOUNT (Becton Dickinson Biosciences, San José CA, EE.UU.), FlowCOUNT (Beckman Coulter, Miami, FL, Estados Unidos) o PerfectCOUNT (Cytognos SL).

10 El experto comprenderá y apreciará que la presente invención que implica estudios de citometría de flujo sobre el análisis CTM puede usarse para (detección temprana) de diversas enfermedades, trastornos u otros cambios y anomalías fisiológicos. Se proporcionan aquí kits de diagnóstico que comprenden los reactivos para realizar un análisis basado en el concepto descrito aquí.

15 El kit de diagnóstico puede comprender en un primer recipiente un conjunto de marcadores de armazón que comprenden anticuerpos marcados diferencialmente dirigidos a la identificación y enumeración de al menos dos, preferiblemente al menos tres subconjuntos diferentes de CD14alto/CD16+, CD14alto/CD16alto, CD14+/CD16alto, CD14bajo/CD16alto CD14-/CD16alto, CD14-/CD16bajo, CD11c+/CD16+, CD11c+/CD16alto, CD11c+/CD16bajo, CD33alto/CD16+, CD33alto/CD16alto, CD33+/CD16alto, CD33+/CD16bajo, CD300e+/CD16+, CD300e+/CD16++ y CD300e+/CD16bajo subconjuntos CTM. Se da a conocer un kit de diagnóstico que comprende en un primer
20 recipiente un conjunto de marcadores de armazón que comprenden anticuerpos marcados diferencialmente, en el que los marcadores de armazón son CD300e, CD14 y CD16 y preferiblemente también HLADR. El kit opcionalmente provee instrucciones para el uso del kit para la identificación y enumeración de al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres, subconjuntos CTM, preferiblemente de acuerdo con un método divulgado aquí.

25 El primer recipiente comprende anticuerpos dirigidos a los marcadores CD14, CD16, CD300e, CD14, CD36 y HLADR. Más preferiblemente, está presente al menos un anticuerpo adicional que está dirigido al marcador CD64 o CD45.

Aguilar et al. (J. Immunol., Vol. 173, No. 11, páginas 6703-6711) describe el análisis de los marcadores individuales CD300e, CD14, CD16, HLA-DR, CD45 y CD64 para inmunotipificación. Sin embargo, no se menciona nada acerca
30 de CD36. Por lo tanto, Aguilar no revela ni sugiere una composición de reactivo que comprende anticuerpos dirigidos contra los marcadores CD14, CD16, CD300e, CD14, CD36 y HLA-DR.

En un aspecto específicamente preferido, la invención proporciona un kit que comprende una combinación de anticuerpos contra CD14, CD16, CD300e, HLADR, CD45, CD64 y CD36 (Figura 4), en donde cada uno de los anticuerpos se conjuga con una marca distinta detectable. Por ejemplo, el kit comprende un anticuerpo CD14
35 conjugado con fluorocromo 1 (FL1), un anticuerpo CD16 conjugado con fluorocromo 2 (FL2), un anticuerpo CD300e conjugado con fluorocromo 3 (FL3), un anticuerpo HLADR conjugado con fluorocromo 4 (FL4), un anticuerpo CD45 conjugado con fluorocromo 5 (FL5), un anticuerpo CD64 conjugado con fluorocromo 6 (FL6), y un anticuerpo CD36 conjugado con fluorocromo 7 (FL7). El experto entenderá que se puede usar cualquier combinación útil de fluorocromos. Por ejemplo, el kit comprende la combinación de fluorocromo APCH7 (por ejemplo, antiCD14-APCH7), PECy7 (por ejemplo anti-CD16-PECy7), APC (por ejemplo, anti-CD300e-APC), PacB (por ejemplo, anti-HLADR-
40 PacB), FITC (por ejemplo anti-CD36-FITC) y PE (por ejemplo, anti-CD64-PE).

Para la identificación de macrófagos circulantes específicos de tejidos, el kit puede contener en un segundo recipiente al menos un anticuerpo de detección marcado que permita la detección de uno o más epítomos sobre al menos un fragmento de proteína inducido por proteasa derivado de la degradación intracelular de una proteína por
45 CTM individual en sus tejidos de origen.

Como se entenderá, los objetivos de detección de anticuerpos se pueden seleccionar de acuerdo con la condición específica o enfermedad de interés. Los anticuerpos útiles (conjugados con fluorocromo) están disponibles comercialmente. La Figura 7 muestra simplemente un conjunto arbitrario de diferentes aplicaciones, cada una de las cuales requiere diferentes anticuerpos de detección. El documento WO2010/015633 (incorporado aquí como
50 referencia) describe en la reivindicación 9 una lista de dianas para anticuerpos útiles.

Las consideraciones útiles para seleccionar un objetivo de anticuerpo de detección incluyen las siguientes. Preferiblemente, el antígeno no es una proteína secretada, tal como PSA, CEA, etc., debido a la posibilidad de que altos niveles séricos de esta proteína den un "fondo difuso" en o sobre subconjuntos CTM. Además, la proteína específica del tejido debe expresarse preferiblemente también en células inmaduras del mismo tejido. Además, los dominios/epítomos de proteína seleccionados preferiblemente no se producirán en ninguna parte del "proteoma", es decir, en otras proteínas.
55

Otro factor relevante para tener en cuenta es el hecho de que la mayoría de los tejidos darán una señal de fondo normal de marcadores CTMs positivos en la sangre, debido al nivel de actividad homeostática entre la proliferación

celular y la apoptosis. Sin embargo, algunas capas epiteliales externas probablemente no darán este "fondo normal". Por ejemplo, en un individuo saludable el epitelio intestinal continuamente renovado será en su mayoría desprendido hacia el lumen del intestino, lo que implica que virtualmente no CTMs con fragmentos de proteína intestinal específicos se espera que estén presentes en la sangre. Sin embargo, si las células epiteliales intestinales se transforman en células invasoras malignas, las CTM locales fagocitarán células malignas apoptóticas y se volverán detectables en sangre como CTSM con fragmentos proteicos específicos de intestino (por ejemplo, colon). La detección de CTSM (aumentado) circulante con fragmentos de proteína en colon específico puede usarse para programas de cribado a escala nacional para la detección temprana de cáncer de colon. Lo mismo es más probable que sea válido para las células epiteliales del pulmón, que se verterán en los alvéolos y los bronquios y muy probablemente sean fagocitados por los macrófagos alveolares que serán removidos de nuestro cuerpo a través de los bronquios (moco extraído a través de movimientos cilíndricos al esputo). Sin embargo, las células epiteliales invasivas (como en el cáncer de pulmón) se traducirá en epitelio pulmonar positivo CTSM en la sangre. Finalmente, se producirá un proceso comparable para la piel, donde se perderán melanocitos normales de la superficie de la piel, lo que contrasta con las células de melanoma, que se vuelven invasivas al pasar la membrana basal. Sólo bajo tales circunstancias, es posible que sea posible detectar CTSM Melan-A-positivo en la sangre sobre el fondo bajo de células Melan-A-positivas derivadas de la retina.

Una aplicación adicional muy importante de un método o kit de acuerdo con la invención es la detección de fragmentos de proteínas no autónomos (es decir, exógenos), tales como en el caso de enfermedades de infecciones insidiosas. Especialmente en el caso de enfermedades infecciosas insidiosas, que son muy difíciles de diagnosticar. Por ejemplo, es muy difícil diagnosticar la tuberculosis (extra-pulmonar), porque todas las pruebas serológicas y de PCR actualmente utilizadas muestran altos niveles de resultados falsos. La detección de fragmentos de proteínas específicas de Mycobacterium en subconjuntos CTM de sangre proporciona una excelente alternativa y potencialmente una herramienta de diagnóstico mucho más confiable también para evaluar la diseminación de la enfermedad en todo el cuerpo. Lo mismo es válido para enfermedades causadas por otros patógenos como la Aspergilosis, la enfermedad de Lyme y la fiebre Q.

En una realización específica, la invención proporciona un kit de diagnóstico en el que el segundo recipiente comprende al menos un anticuerpo de detección que permite la detección de uno o más epítomos derivados de la degradación intracelular de proteínas específicas del músculo cardíaco (por ejemplo troponina o CK-MB), proteínas específicas del hígado/glomérulo, proteínas específicas del hígado o proteínas específicas de los pulmones, con el objetivo de evaluar la supervivencia de órganos tras el trasplante y los procesos de rechazo de trasplantes en pacientes con trasplante de corazón, riñón, hígado o pulmón, respectivamente.

En una segunda realización, un kit de diagnóstico en el que el segundo recipiente comprende al menos un anticuerpo de detección que permite la detección de uno o más epítomos derivados de la degradación intracelular de proteínas específicas del músculo cardíaco proporciona los medios y métodos para detectar angina de pecho o isquemia extensa del corazón (con infarto cardíaco). El TSM de etapa final del músculo cardíaco dañado migra a través del sistema de vasos linfáticos a la sangre, donde pueden ser detectados en cantidades relativamente y absolutamente elevadas como CTSM, que contienen fragmentos de proteínas derivadas de proteínas del músculo cardíaco específico (Figura 7A). Tal análisis podría ser útil para realizar un diagnóstico precoz en la angina de pecho progresiva y/o para monitorizar la extensión y reparación de un infarto de miocardio.

En otra realización, el segundo recipiente en un kit de la invención comprende al menos un anticuerpo de detección que permite la detección de uno o más epítomos derivados de la degradación intracelular de proteínas óseas, tales como osteocalcina, osteopontina o fosfatasa alcalina específica de hueso, permitiendo evaluar la complejidad y extensión de las fracturas óseas y la evaluación de la progresión de la remodelación ósea después de fracturas óseas e intervenciones quirúrgicas. Por ejemplo, puede conseguirse la monitorización del remodelado óseo, por ejemplo en pacientes con fracturas óseas complejas. La enumeración regular de CTSM que contienen fragmentos de proteínas específicas de hueso (por ejemplo, osteocalcina, osteopontina y/o péptidos de fosfatasa alcalina ósea) permite tal monitorización (Figura 7B).

En otra realización, la invención proporciona un kit, por ejemplo, para el diagnóstico precoz y la monitorización de tumores malignos, donde el segundo recipiente comprende al menos un anticuerpo de detección contra uno o más fragmentos proteicos inducidos por proteasa derivados de la degradación intracelular de una proteína epitelial, preferiblemente una proteína epitelial de mama, una proteína de epitelio esofágico, una proteína del epitelio gástrico, una proteína del epitelio del páncreas, una proteína del epitelio del colon, una proteína del epitelio del recto-sigmoide, una proteína del epitelio de la tiroides, una proteína del epitelio del pulmón o del bronquio, una proteína del epitelio de la próstata, una proteína del epitelio de la vejiga, una proteína del epitelio del cuello uterino, una proteína del epitelio del útero, proteína de melanoma, proteína renal-glomérulo, o contra otro marcador de células epiteliales. El diagnóstico precoz y la monitorización del cáncer de colon invasivo pueden lograrse mediante la detección de CTSM en sangre que contiene fragmentos de proteína específicos del epitelio de colon (Figura 7C). Tal aplicación es particularmente valiosa en pacientes con poliposis familiar coli, porque la monitorización regular (por ejemplo, anualmente o cada 6 meses) podría permitir el diagnóstico precoz de la progresión de la poliposis coli en el cáncer de colon invasivo.

En una quinta realización, la invención proporciona un medio y métodos para la detección temprana de metástasis

de carcinoma de mama en el hígado. La selección de pacientes con carcinoma de mama para metástasis en el hígado (o en otros órganos, como el hueso y el pulmón) será posible mediante la búsqueda de CTSM que contengan simultáneamente fragmentos proteicos derivados tanto de proteínas epiteliales de mama como de proteínas específicas del hígado (Figura 7D). La presencia combinada de los dos tipos diferentes de fragmentos de proteínas de dos tejidos completamente diferentes en un CTSM individual, apunta a la presencia de una metástasis, por ejemplo metástasis en el hígado, los huesos, el pulmón o el sistema nervioso central (SNC). En una realización, un método de la invención comprende la detección combinada de fragmentos de proteína específicos de tejido de hígado o hueso, así como de células de carcinoma como medida para metástasis de hígado o hueso de carcinoma de mama, carcinoma de próstata, etc.

El cáncer de próstata progresivo e invasivo necesita ser detectado en una etapa temprana. La invención proporciona medios y métodos para el cribado de pacientes con cáncer de próstata para la presencia de CTSM que contienen péptidos derivados tanto de proteínas epiteliales de próstata como de proteínas específicas de hueso (Figura 7E) u otros tipos de proteínas, por ejemplo hígado, pulmón y SNC. Los enfoques comparables para la detección y la monitorización de las metástasis son posibles para todos los tipos de cánceres.

Otra realización se refiere a la aterosclerosis, en la que los macrófagos de tejido penetran en las placas ateroscleróticas y, muy probablemente, vuelven directamente al vaso sanguíneo tan pronto como se completan sus tareas. Tal CTSM contendrá fragmentos de proteínas de proteínas endoteliales, tales como endotelina 1 (Figura 7F). Un kit de diagnóstico para uso en dicho análisis (por ejemplo, con el objetivo de evaluar la aterosclerosis y la extensión del daño endotelial en pacientes con aterosclerosis) puede comprender por lo menos un anticuerpo de detección que permita la detección de uno o más epítomos derivados de la degradación intracelular de proteínas endoteliales (Por ejemplo endotelina 1),

Una realización adicional se refiere a métodos y kits para el diagnóstico y monitorización tempranos de enfermedad cerebral o nerviosa, en particular Alzheimer, en donde al menos un anticuerpo de detección permite la detección de uno o más epítomos derivados de la degradación intracelular de proteínas específicas del cerebro o del nervio, por ejemplo Apoε4 o, proteína precursora amiloide (APP). El diagnóstico de Alzheimer es con frecuencia retrasado y difícil de confirmar. También el seguimiento de la progresión de la enfermedad es complicado. En consecuencia, un ensayo de diagnóstico independiente de la invención puede soportar el cuidado de pacientes de Alzheimer y sus familias, por ejemplo para el tratamiento de apoyo temprano, así como para la gestión financiera a tiempo. Esto puede conseguirse mediante la detección de CTSM aumentada o en aumento, que contienen fragmentos o péptidos derivados de APP y/u otras proteínas asociadas con tejidos y enfermedades del sistema nervioso central (SNC) (Figura 7G). Elevado número de APP-péptido positivo CTSM podría señalar a la fase inicial de Alzheimer y un mayor aumento de la APP positiva CTSM podría señalar a la progresión de la enfermedad.

Un kit que comprende al menos un anticuerpo de detección que permite la detección de uno o más epítomos derivados de la degradación intracelular de proteínas específicas del cerebro también encuentra su uso en el diagnóstico precoz de accidentes cerebrovasculares (CVA's), por ejemplo, en pacientes con ataques isquémicos transitorios recurrentes (TIA) y en el seguimiento posterior de la extensión y recuperación del infarto cerebral.

Otra realización se refiere a Esclerosis Múltiple (EM). El diagnóstico de la EM es complejo y se beneficiaría de un análisis diagnóstico independiente, que también puede utilizarse para monitorizar la progresión de la enfermedad. Esto se puede lograr utilizando un método proporcionado en el presente documento que implica la detección precisa de las frecuencias relativa y absoluta de CTSM que contienen péptidos específicos de mielina, derivados de la degradación de las vainas de mielina que cubren los nervios (Figura 7H).

Se proporciona un kit de diagnóstico adecuado para el diagnóstico precoz y la confirmación de enfermedades autoinmunes y la monitorización de enfermedades autoinmunes, como anemia aplásica, diabetes mellitus tipo I, tiroiditis, cistitis autoinmune, síndrome de Sjögren, glomerulonefritis autoinmune, artritis reumatoide, esclerosis sistémica y otras enfermedades autoinmunes del tejido conectivo. Dicho kit puede comprender en el segundo recipiente al menos un anticuerpo de detección que permita la detección de uno o más epítomos derivados de la degradación intracelular de una proteína seleccionada del grupo que consiste en factor intrínseco, islote de proteínas específicas de Langerhans o insulina, proteínas del epitelio tiroideo, proteínas del epitelio de la vejiga, proteínas específicas de la glándula lagrimal y/o de las glándulas salivales, proteínas específicas del glomérulo del riñón, proteínas específicas de la membrana sinovial, proteínas específicas del músculo y del tejido conjuntivo, por ejemplo, el diagnóstico precoz o la confirmación de la tiroiditis tóxica o autoinmune puede ser, por detección de las frecuencias relativa y absoluta de CTSM, que contienen fragmentos de proteínas derivadas de proteínas específicas del tejido tiroideo (Figura 7I).

El diagnóstico del síndrome de Sjögren es difícil y se realiza generalmente después de un retraso sustancial, también debido al diagnóstico diferencial complejo. Un aumento de los recuentos de CTSMs que contienen fragmentos de la glándula parótida o proteínas de la glándula lagrimal puede apoyar significativamente el proceso de diagnóstico (Figura 7J).

Los niños pequeños de una familia con desarrollo frecuente de Diabetes Mellitus Tipo 1, pueden ser monitorizados para la presencia de CTSM que contienen fragmentos o péptidos de islotes de Langerhans u otras proteínas

específicas, tales como insulina (Figura 7K). Este examen permitirá un diagnóstico precoz antes de que se desarrolle una diabetes abierta, lo que permite una intervención temprana con inmunomodulación o supresión inmune.

5 También en pacientes con esclerosis sistémica, el diagnóstico no siempre se puede hacer fácilmente. Por lo tanto, el sistema CTM podría utilizarse para la detección temprana de fibrosis y vasculopatía a través de la presencia de fragmentos de proteínas del tejido conectivo y proteínas de las células endoteliales (Figura 7L).

10 Los pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) desarrollan frecuentemente glomerulonefritis progresiva, resultando finalmente en insuficiencia renal irreversible. Dicho daño renal generalmente se descubre en una etapa tardía cuando la mayoría de la función renal ya se ha perdido y por lo tanto no permite más un tratamiento inmunosupresor. Por lo tanto, proponemos que todos los pacientes con LES sean monitorizados regularmente para la presencia y el aumento de CTSM, que contienen fragmentos de proteínas específicas de riñón (Figura 7M). El diagnóstico precoz del daño renal (mucho antes de que se encuentren niveles de creatinina incrementados) permitirá la intervención temprana con inmunomodulación u otro tratamiento inmunosupresor.

15 Una realización adicional se refiere a enfermedades causadas por (infección con) microorganismos tales como la enfermedad de Lyme. El diagnóstico de la enfermedad de Lyme es frecuentemente complejo debido a un cuadro clínico no típico y/o la ausencia de síntomas clásicos como las lesiones cutáneas relacionadas con la picadura de garrapata. El retraso en el diagnóstico de complicaciones en pacientes con enfermedad de Lyme puede provocar daños irreversibles en los órganos. En consecuencia, es clínicamente relevante disponer de un ensayo de diagnóstico independiente para el diagnóstico de la enfermedad de Lyme. Esto se puede lograr mediante la
20 detección de CTSM, que contienen péptidos de proteínas específicas de Borrelia (Figura 7N]. Preferiblemente, los epítomos seleccionados para la elevación de anticuerpos deben ser independientes de la cepa de Borrelia, de manera que cada tipo de infección de Borrelia puede detectarse con un único ensayo. De lo contrario, se pueden usar múltiples anticuerpos contra péptidos de varios tipos diferentes de cepas de Borrelia para identificar la cepa de Borrelia implicada que causó la enfermedad de Lyme en un paciente específico.

25 Las pruebas de diagnóstico convencionales para la tuberculosis tienen varias limitaciones, particularmente en el caso de la tuberculosis extrapulmonar. Se han desarrollado varios análisis de suero basados en anticuerpos, pero todos ellos faltan al menos en parte al diagnóstico extrapulmonar. Sin embargo, la detección de CTSM, que contiene fragmentos de Mycobacterium Tuberculosis puede contribuir al diagnóstico preciso de la Tuberculosis extrapulmonar (Figura 7O).

30 Los pacientes con granulopenia son altamente susceptibles a la aspergilosis. Cuanto más temprano sea el diagnóstico de aspergilosis, mejor será el desarrollo de la enfermedad. En consecuencia, podría ser conveniente monitorizar a todos los pacientes con granulopenia para la presencia (y aumento) de CTSM que contienen fragmentos de aspergillus, independientemente de la cepa implicada (Figura 7P).

35 Por lo tanto, también se proporciona un kit de diagnóstico en el que el segundo recipiente comprende al menos un anticuerpo de detección que permite la detección de uno o más epítomos derivados de la degradación intracelular de proteínas de un patógeno como un virus, una bacteria, un hongo, tal como virus de la hepatitis, Borrelia, Mycobacterium o Aspergillus para la detección temprana (o confirmación del diagnóstico) y la monitorización de la hepatitis, la enfermedad de Lyme, la tuberculosis, la lepra o la aspergilosis. En un aspecto específico, el kit de diagnóstico está dirigido al diagnóstico precoz y monitorización de la localización ósea de la tuberculosis y la
40 aspergilosis, y comprende en el segundo recipiente al menos un anticuerpo de detección que permite la detección de uno o más epítomos derivados de la degradación intracelular de proteínas del hueso así como al menos un anticuerpo de detección que permite la detección de uno o más epítomos derivados de la degradación intracelular de una proteína de un Mycobacterium o Aspergillus.

45 La invención también encuentra su uso en la monitorización de la formación de deportistas en su entrenamiento de resistencia, más específicamente para determinar si un individuo está subentrenado o sobreentrenado. Los deportes de resistencia necesitan programas de entrenamiento cuidadosos para alcanzar el estado de entrenamiento correcto en el momento adecuado en competición. La frecuencia y la intensidad óptimas de entrenamiento pueden diferir significativamente entre individuos y pueden depender de factores físicos, ambientales y genéticos (raza), los cuales son actualmente desconocidos. Además, la recuperación después del ejercicio físico de alto nivel podría ser
50 diferente entre los deportistas individuales. Guiar el entrenamiento y la recuperación de deportistas en deportes de resistencia podría ser apoyado por un cuidadoso monitoreo del compartimiento de CTSM, que es positivo para péptidos derivados de proteínas de armazón (Figura 7Q). Esto podría conducir a una mejor guía de los deportistas en sus horarios de entrenamiento con el fin de prevenir tanto el sobreentrenamiento como el subentrenamiento y podrían resultar en una mejora significativa de los resultados deportivos individuales.

55 Una realización adicional se refiere a la evaluación del daño tisular, por ejemplo para evaluar las habilidades quirúrgicas de los residentes en cirugía o para evaluar dos o más procedimientos quirúrgicos diferentes para la misma indicación médica. La detección y enumeración de CTM o CTSM (con péptidos de músculo esquelético o tejido conectivo, por ejemplo, péptidos derivados de colágeno) puede servir para tal evaluación (Figura 7R). Se proporciona un kit de diagnóstico en el que el segundo recipiente comprende al menos un anticuerpo de detección

que permite la detección de uno o más epítomos derivados de la degradación intracelular del músculo esquelético. Tal kit encuentra su uso en la supervisión y guía de la formación y recuperación de deportistas en eventos deportivos (internacionales), como en deportes de resistencia (por ejemplo, maratón, triatlón, patinaje, natación, ciclismo, esquí).

5 Todavía en una realización adicional, la invención se puede usar para proporcionar una evaluación del perfil de CTSM personal para el estado de salud. La distribución del subconjunto de CTSM es muy probable que sea ligeramente diferente entre los individuos, ya que dicha composición depende de la edad y otros parámetros, tales hábitos de estilo de vida (por ejemplo, el consumo de tabaco y el alcohol), así como actividades como los deportes. Un monitoreo regular (por ejemplo, anual o 6 meses) de individuos puede dar una buena idea del estado de salud y
10 permite la detección temprana y el diagnóstico de la enfermedad. La invención permite el diseño de perfiles CTSM personalizados que se pueden utilizar para detectar riesgos y peligros específicos, tales como:

- Exposición profesional (toxinas industriales, etc.);
- Hábitos de estilo de vida (fumar, comer, beber, etc.);
- Enfermedades asociadas a la familia (cardiovascular, cáncer, Alzheimer, etc.) Se puede monitorizar individualmente una combinación personalizada específica de péptidos derivados de tejidos, con el objetivo de
15 prevención y/o diagnóstico precoz.

Leyenda de las figuras

Figura 1. Los macrófagos del tejido CD16+ en la sangre no se derivan directamente de los monocitos clásicos CD14+/CD16, sino de los macrófagos tisulares, que han contribuido activamente a la vigilancia y a la fagocitosis en
20 los tejidos y que han recirculado a través del sistema de los vasos linfáticos al torrente sanguíneo (Van Dongen y Orfao, datos no publicados).

Figura 2. Varios tipos de subconjuntos de monocitos/macrófagos pueden ser detectados mediante estrategias de bloqueo citométrico de flujo preciso, seguido por análisis de patrones de tinción CD14 y CD16. A. En un donante sano los monocitos clásicos son CD14⁺/CD16⁻; mientras que la población CTM exhibe una expresión heterogénea (het) de CD14 y CD16, lo que indica que esta población consta de varios subconjuntos. B. En pacientes con una
25 enfermedad infecciosa (por ejemplo, *Francisella tularensis*), los subconjuntos de CD14^{het}/CD16^{het} son relativamente y absolutamente aumentados. C. Varios subconjuntos CTM pueden ser identificados en el diagrama de puntos CD14-CD16 del paciente con la infección por *Francisella tularensis* (A. Orfao et al., resultados no publicados).

Figura 3. La discriminación precisa entre los monocitos CD14^{high}/CD16⁻clásicos y las CTM más heterogéneas puede mejorarse mediante el análisis de componentes principales (APS véase a través de software Infinicyt, Cytognos, Salamanca, ES) de todos los marcadores evaluados, tales como CD14, CD16, CD33, CD45, CD64, CD123, CD300e y HLADR. A. El diagrama de puntos CD14/CD16 y CD14/CD123 sugieren que los monocitos clásicos y CTM
30 representan un continuo. B. El análisis de componentes principales de los 8 marcadores en APS 1 muestra que los monocitos clásicos y CTM son poblaciones separadas. En APS 2, las dos poblaciones parecen estar estrechamente relacionadas.

Figura 4. La tinción para la expresión de CD14, CD16, CD36, CD45, CD64, CD300e y HLADR sobre leucocitos sanguíneos da como resultado un reconocimiento altamente exacto de monocitos clásicos y al menos tres subconjuntos CTM: CTM temprana, subconjuntos CD36+ CTM tardío y un tardío CD36- CTM subconjunto. En la tinción presentada, se realiza la primera activación en SSC intermedio y CD45 (Panel A), seguido por la
40 determinación de inclusión basada en la positividad para CD300e y HLADR (Panel B). Las células incluidas representan todos los monocitos clásicos y todos los CTM, que pueden evaluarse además con los marcadores CD14 y CD16 (Panel C), resultando en tres subconjuntos principales: monocitos clásicos, CTM temprana y CTM tardía (Panel D). El reconocimiento exacto de la CTM temprana y subconjunto adicional de las CTM es posible con CD64 y CD36 (Paneles E y F). CD64 se expresa a niveles más altos en CTM temprana (y en monocitos clásicos), mientras que todos los otros subconjuntos CTM expresan CD64 a niveles más bajos (Panel F). La CTM baja de CD64 (CTM tardía) tiene una expresión heterogénea de CD36 de alto a negativo (Panel E y F). El punto de vista APS con los siete marcadores evaluados muestra una separación clara de las diversas poblaciones de células de monocitos/macrófagos (Panel G), es decir, los monocitos clásicos, CTM temprana, subconjuntos tardíos de CTM, incluyendo el subconjunto CD36-CTM tardío (Panel H).

Figura 5. La tinción para CD 14, CD16, CD36, CD45, CD64, CD300e y HLADR sobre leucocitos sanguíneos da como resultado un reconocimiento preciso de monocitos clásicos y subconjuntos CTM. Estos subgrupos de monocitos y CTM pueden diferir en su composición dependiendo de la edad (infancia, adolescencia, adultos, ancianos), tipo de enfermedad (local, sistémica, etc.), etapa de la enfermedad (aguda, crónica, ardorosa, etc.). El panel A muestra un patrón de poblaciones de células CD300e / HLADR encontradas típicamente en adultos. Por el
50 contrario, la muestra de sangre de un niño enfermo en el panel B exhibe un patrón diferente con la presencia prominente de una población de CDM16baja/CD14-/CD36-/CD64baja, que es pequeña o ausente en sangre de adulto. Para tener en cuenta: la mayoría de CT36-CTM tardía en sangre de adultos expresa CD16 en altos niveles.

Figura 6. Resultados de tinción de CD14/CD16/CD45/CD300e/HLADR/GFAP en muestras de sangre de 9 controles sanos y 9 pacientes de glioma en el momento del diagnóstico. El anticuerpo anti-GFAP se dirigió contra un epítipo N-terminal sobre la proteína. Panel A: ejemplos de tinción con GFAP en un control sano (panel izquierdo) y en un paciente con glioma (panel derecho). En el paciente con glioma, se identifica un aglomerado de CTMs tempranas positivas para GFAP, mientras que dichas células no se detectan en el control sano. Panel B: el porcentaje de células GFAP+ dentro de la población de CTM temprana se representa frente al porcentaje de CTM tempranas por células CD300e+ totales (monocitos y CTM) y contra el tamaño del glioma. Virtualmente todos los pacientes con glioma (7/9) tenían más del 1% de GFAP+ CTM tempranas. Es importante destacar que la frecuencia de células GFAP positivas también muestra cierta correlación con el tamaño de la masa tumoral de glioma.

- 5
- 10
- 15
- Figura 7. Ejemplos de aumento de CTSM en diferentes tipos de enfermedades o condiciones médicas. A. Infarto de miocardio. B. Fractura ósea. C. Cáncer de colon. D. Cáncer de mama con metástasis. E. Carcinoma metastásico en hueso. F. Aterosclerosis. G. Enfermedad de Alzheimer. H. Esclerosis múltiple. I. Tiroiditis autoinmune. Síndrome de J. Sjögren. K. Diabetes mellitus tipo 1. L. Esclerosis sistémica. M. Glomerulonefritis en pacientes con LES. N. Enfermedad de Lyme. O. Tuberculosis. P. Aspergillus pulmonar. Q. Entrenamiento muscular. R. Intervención quirúrgica con daño tisular.

Ejemplo 1:

Aplicaciones de CTSM basado Flow Cytometric Health Scanning: Determina la distribución de los subconjuntos CTSM y, por tanto, los cambios fisiológicos y no fisiológicos en la homeostasis de la renovación celular, mantenimiento, reparación, senescencia y apoptosis.

- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
1. Condiciones fisiológicas: crecimiento, envejecimiento, embarazo, menopausia, actividad física, ritmos circadianos;
 - Crecimiento en niños: desarrollo de órganos en la infancia, niñez, adolescencia, por ejemplo, alta actividad en el compartimento óseo (crecimiento y remodelación) y consecuente aumento en el subgrupo CTSM con péptidos derivados de hueso;
 - Compartimento de células precursoras linfoides altamente activas para la producción de un gran número de linfocitos B y T en niños pequeños, lo que se refleja en un timo grande de estos niños pequeños;
 - Envejecimiento: senescencia con involución de órganos y aumento de subconjuntos CTSM;
 - Embarazo: función placentaria y disfunción (detección precoz de la intoxicación placentaria y del tiempo de parto);
 - Involución del timo y reducción de la producción de células T: muchas células T (~90%) se seleccionan negativamente en el timo;
 - Función ovárica: detección de menopausia (prematura) por disminución de la CTSM ovárica.
 - Formación ósea y densidad ósea: evaluación de la formación ósea y de la resorción ósea durante el envejecimiento, por ejemplo, en la pubertad/adolescencia, el envejecimiento y la menopausia precoz.
 2. Hábitos de estilo de vida: por ejemplo:
 - Fumar: evaluación del daño pulmonar a través de la medición del equilibrio de la mucosa y las células epiteliales;
 - Alcohol: evaluación del daño hepático en relación con la ingesta de alcohol;
 - Deportes: evaluación de CTSMs derivados de músculos en deportes duraderos (por ejemplo, maratón, triatlón) para diseñar programas de entrenamiento personalizados para deportistas de alto nivel con capacidades de recuperación diferencial;
 - Exposición a la luz solar/UV de la piel: medición de péptidos de epitelio de la piel y péptidos de melanina para evaluar el nivel de exposición UV y el daño relacionado (extensión superficial e intensidad de la exposición a los rayos UV).
 3. Exposición a agentes ambientales

La evaluación directa de componentes tóxicos en macrófagos de tejido o mediciones de toxicidad indirecta en los tejidos implicados, tal como en el caso de:

 - Asbestos;
 - Materiales neurotóxicos en pinturas;
 - Consecuencias de la irradiación después de accidentes nucleares.
 4. Daño tisular general (piel, mucosa, músculos y/o hueso):

- Traumatismo: extensión del traumatismo y seguimiento del progreso de la recuperación;
 - Intervenciones quirúrgicas: por ejemplo, evaluación del daño tisular postquirúrgico como una medida de la "calidad de la cirugía", por ejemplo, para la evaluación de habilidades técnicas de los residentes en cirugía.
 - Efectos de la sepsis con múltiples lesiones en todo el cuerpo.
- 5
- Daño a órganos y otros efectos secundarios tóxicos no deseados de la intervención médica, como en el tratamiento del cáncer.
 - Influencias de la temperatura en tejidos específicos, por ejemplo quemar heridas (tamaño, profundidad y superficie del cuerpo);
- 10
- Fracturas óseas y complejidad y extensión de las fracturas (por ejemplo, medición de péptidos de osteocalcina y/o péptidos de osteopontina y/o péptidos de fosfatasa alcalina ósea).
5. Enfermedades inflamatorias y autoinmunes:
- Extensión de enfermedades autoinmunes, como la esclerosis sistémica;
 - Enfermedad de Sjögren: diagnóstico precoz y definición más precisa sobre la participación de las glándulas lagrimales y las glándulas salivales a través de la medición de péptidos epiteliales específicos;
- 15
- Cistitis autoinmune; medición de péptidos del epitelio vesical de CTSM;
 - Glomerulonefritis: extensión del daño renal en nefritis autoinmune o detección temprana de daño renal en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) o detección temprana de procesos de rechazo en pacientes tras trasplante de riñón;
 - Artritis reumatoide: detección de componentes de las articulaciones (péptidos de membrana sinovial) en CTSM;
- 20
- Vasculitis: por ejemplo, arteritis temporalis con CTSM que contienen péptidos de células endoteliales.
6. Trastornos neurológicos y neurodegenerativos:
- Enfermedad de Alzheimer: diagnóstico temprano mediante CTSM con péptidos de proteínas asociadas a la enfermedad tales como Apoε4 mutado y APP.
 - Esclerosis múltiple: por ejemplo, detección de péptidos de mielina en CTSM.
- 25
- Enfermedad de Parkinson
 - Enfermedades de priones, como la enfermedad de Jacob-Kreutzfeld
7. Enfermedades infecciosas (particularmente con persistencia del carácter ardoroso e insidioso)
- Detección combinada de péptidos específicos de tejido y péptidos específicos de microorganismos en los mismos subconjuntos de TSM:
- 30
- Infecciones por Mycobacterium: diagnóstico difícil en pacientes BCG positivos y en niños;
 - Fiebre Q: diagnóstico difícil y difícil evaluación de la eficacia del tratamiento;
 - Enfermedad de Lyme: detección de péptidos derivados de Borrelia en pacientes con compresiones vagas en los que el diagnóstico de la enfermedad sigue siendo un reto;
 - Hepatitis B y Hepatitis C: monitorización del daño hepático y/o péptidos derivados de proteínas virales.
- 35
- Diagnóstico de infecciones invasivas de hongos y levaduras: diagnóstico difícil de infecciones por Aspergillus; la detección de antígenos fúngicos en los macrófagos del tejido circulante y la identificación del tejido involucrado mediante identificación de CTSMs involucrados.
8. Trastornos metabólicos:
- 40
- Obesidad: por ejemplo, diferentes perfiles específicos de enfermedades de fragmentos de proteínas derivadas de adipocitos;
 - Diabetes tipo 1 (diabetes juvenil dependiente de insulina): detección temprana, antes de que se produzca un daño mayor de las células productoras de insulina en el páncreas;
 - Diabetes tipo 2 (inicio tardío): aumento de los macrófagos del tejido CD14dim/CD16++ con disminución de la

función (producción de citoquinas), si se presentan complicaciones ateroscleróticas;

- Tratamiento con testosterona en el hipogonadismo: aumento de los macrófagos tisulares, pero reducción de la función.

9. Enfermedades de origen desconocido:

5 Por ejemplo: detección de péptidos derivados de músculo y otros marcadores de enfermedad (por ejemplo, componentes víricos):

- Fibromialgia;

- Síndrome de fatiga crónica: detección de componentes virales en macrófagos tisulares.

10 • Fiebre de origen desconocido (idiopático): definición del perfil de CTSM, como reflejo directo del daño asociado al tejido.

10. Enfermedades malignas:

En el caso de la mayoría de los carcinomas, el antígeno de membrana epitelial puede usarse como marcador general en combinación con uno o más marcadores específicos de tejido

- Carcinomas en general: por ejemplo, péptidos de EMA (antígeno de membrana epitelial);

15 • Carcinoma de mama: por ejemplo, péptidos del antígeno CA 15-3;

- Carcinoma tiroideo: por ejemplo, péptidos de RET como marcador tumoral;

- Carcinoma de esófago;

- Carcinoma gástrico;

- Carcinoma de colon: por ejemplo, péptidos del antígeno carcinoembrionario (CEA);

20 • Carcinoma de recto/sigmoide;

- Carcinoma de pulmón;

- Carcinoma de cuello uterino o carcinoma de útero:

- Carcinoma de próstata: por ejemplo, péptidos PSA y ERG;

- Carcinoma de vejiga;

25 • Melanoma: por ejemplo, péptidos de melanina; MART-1/Melan-A

- Carcinoma de páncreas;

- Carcinoma renal, etc .;

- Neuroblastoma: por ejemplo, péptidos del disialogangliósido GD2;

- Tumores cerebrales, por ejemplo GFAP (Figura 6);

30 • Mesotelioma: detección de trabajadores expuestos al asbesto y diagnóstico en fase temprana a través de péptidos derivados de mesotelio en macrófagos de tejido en circulación;

- Cánceres raros, que son difíciles de diagnosticar, como los tumores de hipófisis.

11. Detección precoz y seguimiento de las metástasis tumorales:

35 La detección combinada de péptidos y péptidos derivados de tumores a partir del tejido infiltrado en el mismo subconjunto de CTSM, por ejemplo:

- Metástasis de carcinoma de mama en hueso o hígado: detección combinada de péptidos derivados de mama y péptidos óseos o derivados del hígado en el mismo subgrupo de TSM;

- Metástasis del carcinoma de colon en el hígado: detección combinada de péptidos derivados del colon y péptidos derivados del hígado en el mismo subconjunto CTSM;

40 • Metástasis de carcinoma de próstata en hueso: detección combinada de péptidos derivados de colon y péptidos derivados de hueso en el mismo subconjunto CTSM;

- Linfoma intravascular de células B: detección combinada de péptidos derivados de endotelio y péptidos derivados de células B en el mismo subconjunto CTSM (niveles elevados de macrófagos tisulares detectados: >10% de leucocitos sanguíneos)

- Linfoma intracerebral: detección combinada de péptidos del SNC y péptidos de células B en los mismos CTSM's

5 12. Enfermedades cardiovasculares:

- Angina de pecho: aberraciones de ECG con o sin infarto de miocardio;
- Trastorno de coagulación en pacientes con riesgo de trombosis
- Lesiones ateroscleróticas en pacientes con diabetes tipo II

Ejemplo 2: Coloración de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en CTM de pacientes con glioma y controles sanos.

10 Materiales y métodos

Las muestras de sangre recién recogidas de pacientes con glioma (n=9) en el momento del diagnóstico (antes de la intervención quirúrgica) y de controles sanos (n=9) se sometieron primero a tinción superficial con la CD300e(UP-H2)-APC (Immunostep, (Immunostep, Salamanca, España) CD14(MO-P9)-APCH7 (BD Biosciences San José, CA, EUA), CD16 (3G8)-PECy7 (BD Biosciences San José, CA, EE.UU.), CD45 (HI30)-PacO (InVitrogen , Grand Island, NY, EE.UU.) y HLADR(L243)-PacB (BioLegend, San Diego, CA, EE.UU.) de acuerdo con el procedimiento de tinción descrito en la Tabla 2 (Procedimiento A, etapas 1 a 13). Después de la tinción de la membrana superficial, las muestras se sometieron a una tinción intracelular con el anticuerpo anti-GFAP (N-18)-PE según el procedimiento de tinción descrito en la Tabla 2 (Procedimiento B, etapas 16 a 43). El anticuerpo anti-GFAP se dirigió contra un epítipo N-terminal de la proteína y se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.). La fijación celular y permeabilización se realizó con Fix & Perm (An der Grub, Viena, AT). Las células teñidas se midieron con un citómetro de flujo multicolor FACSCanto II (BD Biosciences) y los datos se analizaron con el software Infinicyt (Cytognos, Salamanca, España). La regulación de los monocitos y CTMs se basó en regulación en intermedia SSC y CD45 expresión y posterior regulación en positividad en CD300e y HLADR (véase la Figura 4 para el patrón general de tinción). Posteriormente se realizó un análisis adicional para la expresión de CD16 y CD14, seguido de evaluación para la tinción intracelular de GFAP (véase la Figura 6A).

Resultados

El porcentaje de CTM tempranas se expresó por población total evaluada (monocitos clásicos + todas las CTM) y la positividad de GFAP se expresó como porcentaje de células positivas dentro de la población de CTM temprana. Todos los controles sanos tenían menos de 10% de CTM tempranas y 6/9 controles sanos tenían menos de 5% de CTM tempranas. Los porcentajes de CTM tempranas positivas para GFAP en los nueve controles sanos fueron inferiores al 1% (0,6%, 0,7% y 7 veces 0%) (véase Figura 6B). Los pacientes con glioma tuvieron más del 5% de MC tempranas en 8/9 casos y más del 10% en 4/9 casos. Los porcentajes de CTM tempranas positivas para GFAP variaron de ~1% a ~31% (0,9%, 1,0%, 1,3%, 1,4%, 2,5%, 4,5%, 8,7%, 29,9%, 30,7%). Los porcentajes de CTM positivas para GFAP mostraron cierta correlación con el tamaño de la masa tumoral de glioma (véase la figura 6B).

35

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el estado de salud de un sujeto, para la detección temprana de daño tisular, para el diagnóstico precoz y el control de una enfermedad, y/o para la evaluación de la eficacia del tratamiento en un sujeto usando macrófagos de tejido en circulación como espejo homeostasis interrumpida y enfermedad en un tejido, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 a) tinción de una muestra de ensayo biológica aislada del sujeto, cuya muestra se sabe o se espera que contenga macrófagos de tejido en circulación (CTM) con un panel de anticuerpos distintos diferenciadamente marcados contra los marcadores de armazón CD14, CD16 y CD300e y preferiblemente además HLADR, para la identificación y enumeración de diferentes subconjuntos de MC;
- 10 b) fijación, permeabilización y tinción de la CTM usando uno o más anticuerpos de detección dirigidos contra uno o más epítomos sobre al menos un fragmento proteico inducido por proteasa derivado de la degradación intracelular de una proteína no CTM por CTM individual en sus tejidos de origen, identificando de este modo al menos un subconjunto de macrófagos circulantes específicos de tejidos (CTSM);
- 15 c) análisis por citometría de flujo multiparamétrico de dichos CTM y CTSM teñidos por regulación para los marcadores de la armazón CD14, CD16 y CD300e para determinar la cantidad de señales de cada anticuerpo marcado distinto asociado con células individuales, en donde el análisis comprende realizar una estrategia de regulación basada en la expresión de la superficie celular de CD300e, CD14 y CD16, en combinación con análisis de dispersión lateral (SSC), y en la que la estrategia de regulación está compuesta de (i) una etapa de inclusión para incluir monocitos clásicos y CTM basados en la expresión de CD300e en combinación con el análisis por dispersión lateral (SSC), y (ii) una etapa subsiguiente de identificación de subconjuntos para discriminar los monocitos clásicos CD14alto/CD16 de CTM e identificar subconjuntos dentro de la población CTM;
- 20 d) determinar el número relativo y absoluto de células individuales dentro de cada subconjunto CTM y cada subconjunto específico de CTSM que expresan cada uno de los epítomos intracelulares medidos;
- 25 e) calcular (i) el número relativo y absoluto de células dentro de cada subconjunto CTM y cada subconjunto específico de CTSM, cada uno de los cuales proviene de diferentes tejidos normales y alterados como se define por un conjunto de fragmentos individuales de proteína inducida por proteasa evaluados, y ii) la cantidad de la señal relacionada con anticuerpos asociada a cada péptido intracelular individual evaluada para obtener un perfil de tinción CTSM de ensayo; y
- 30 f) comparar el perfil de tinción CTSM de ensayo con un perfil de tinción CTSM normal para cada tejido evaluado, en el que un perfil de tinción de ensayo aberrante es indicativo de daño tisular, alteración de la homeostasis del tejido, presencia de una enfermedad y/o efectividad del tratamiento frente a resistencia.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa a) comprende la tinción con anticuerpos dirigidos a los marcadores CD300e, CD14, CD16 y HLADR.
- 35 3. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en el que la etapa a) comprende además la tinción con anticuerpos dirigidos a uno o más de los marcadores CD45, CD64 y CD36.
4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa c) comprende realizar una estrategia de regulación basada en la expresión de la superficie celular de CD300e, CD14, CD16 y HLADR, en combinación con análisis de dispersión lateral (SSC).
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la estrategia de regulaciones se compone de
- 40 (i) una etapa de inclusión para incluir monocitos clásicos y CTM basados en la expresión de CD300e y HLADR, en combinación con análisis de dispersión lateral (SSC), y
- (ii) una etapa subsiguiente de identificación de subconjuntos para discriminar los monocitos CD14alto/CD16 clásicos de CTM e identificar subconjuntos dentro de la población CTM.
6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende uno de los siguientes:
- 45 (i) tinción de al menos CD300e, CD14 y CD16, y regulación sobre una combinación de células SSC más CD300e+ para seleccionar células con SSC de bajo a intermedio que expresan CD300e;
- (ii) tinción de al menos CD300e, CD14, CD16 y HLADR, y regulación sobre una combinación de dispersión lateral (SSC) más células CD300e+ y HLADR+ para seleccionar células con SSC de bajo a intermedio que simultáneamente coexpresan CD300e y HLADR; o
- 50 (iii) tinción para al menos CD300e, CD14, CD16, CD45 y HLADR, y regulación de una combinación de células SSC más células CD300e+, CD45+ y HLADR+, preferiblemente bloqueando células con CD45 y SSC bajo a intermedio que simultáneamente coexpresan CD300e y HLADR.

7. Método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que la etapa de identificación del subconjunto comprende la identificación de monocitos CD14alto/CD16 clásicos y dos subconjuntos CTM principales identificados como células CD14alto/CD16bajo a CD14alto/CD16alto, CD14bajo/CD16alto y CD14-/CD16alto a CD14-/CD16bajo.
- 5 8. Método de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que la etapa de identificación del subconjunto CTM comprende:
- regulación en CD64bajo representando etapa CTM tardía versus CD64alto representando monocitos clásicos más etapa CTM temprana, seguido por
 - discriminación entre monocitos y CTM mediante la selección de todas las demás células CTM tempranas frente a los monocitos clásicos como aquellos eventos que llevan un fenotipo CD16+/CD14+ y que definen el compartimento CTM completo como CD64lo y CD16+/CD14+/CD64alto, seguido por
 - subdividir adicionalmente la CTM seleccionada basada en los niveles de expresión de CD64, CD14 y CD16 en compartimentos funcionales o de maduración distintos asociados.
- 10 9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la etapa de subdividir adicionalmente la CTM seleccionada se basa en CD64, CD14, CD16 y CD36.
- 15 10. Método de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende la identificación de al menos uno de los siguientes subconjuntos CTM: desde CD64alto/CD36alto/CD14alto/CD16bajo a CD64alto/CD36alto/CD14alto/CD16alto, CD64alto/CD36alto/CD14bajo/CD16alto, CD64bajo/CD36alto/CD14-/CD16alto y CD64bajo/CD14-/CD16bajo/CD36- a células bajas.
- 20 11. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica comprende sangre periférica, fluido ascítico, efusión pleural, fluido cerebroespinal, médula ósea, ganglio linfático, fluido linfático, fluido sinovial o una suspensión de una sola célula preparada a partir de un tejido sólido.
- 25 12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos uno de los anticuerpos detectores permite la detección de uno o más epítomos peptídicos derivados de una proteína aberrante, preferiblemente en el que la proteína aberrante se selecciona del grupo que consiste en proteínas oncogénicas, proteínas mutadas, proteínas de fusión, proteínas derivadas de un alérgeno y proteínas derivadas de un patógeno como un virus, una bacteria, un parásito o un hongo.
- 30 13. Un kit de diagnóstico que comprende en un primer recipiente anticuerpos marcados diferencialmente contra los marcadores CD300e, CD14, CD16, HLADR y CD36.
- 35 14. Un kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el primer recipiente comprende además al menos un anticuerpo seleccionado del grupo de anticuerpos dirigido al marcador CD64 o CD45.
- 40 15. Kit de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el primer recipiente comprende anticuerpos contra CD300e, CD14, CD16, HLADR, CD45, CD64 y CD36.
- 45 16. Kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, que comprende además un segundo recipiente que comprende al menos un anticuerpo de detección dirigido contra uno o más epítomos sobre al menos un fragmento proteico inducido por proteasa derivado de la degradación intracelular de una proteína no CTM por CTM individuales en sus tejidos de origen.
- 50 17. Kit de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el segundo recipiente comprende al menos un anticuerpo de detección dirigido contra uno o más fragmentos proteicos inducidos por proteasa derivados de la degradación intracelular de una proteína del epitelio, preferiblemente una proteína del epitelio del seno, una proteína del epitelio del esófago, una proteína del epitelio gástrico, una proteína del epitelio del páncreas, una proteína del epitelio del colon, una proteína del epitelio del recto-sigmoide, una proteína del epitelio del tiroides, una proteína del epitelio del pulmón o bronquios, una proteína del epitelio de la próstata, una proteína del epitelio de la vejiga, una proteína del epitelio del cuello uterino, una proteína del epitelio del útero, una proteína del melanoma (por ejemplo, Melan-A), una proteína del glomérulo del riñón, o contra otro marcador de células epiteliales, que opcionalmente comprende además instrucciones para su uso en el diagnóstico y monitorización tempranos de tumores malignos.
- 55 18. Un kit de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el segundo recipiente comprende al menos un anticuerpo de detección que permite la detección de uno o más epítomos derivados de la degradación intracelular de proteínas específicas del cerebro o del nervio, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en Apoε4, proteína precursora amiloide (APP), GFAP y mielina, que opcionalmente comprende además instrucciones para su uso en el diagnóstico precoz y la monitorización de la enfermedad de Alzheimer, glioma o esclerosis múltiple.

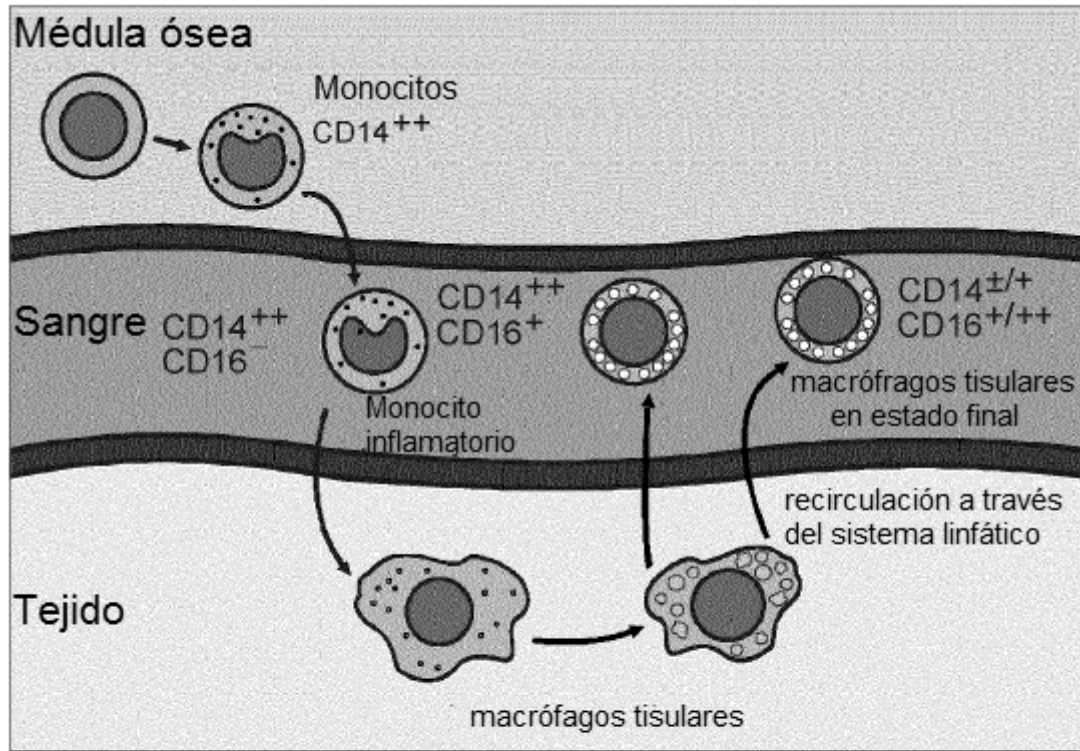


Figura 1

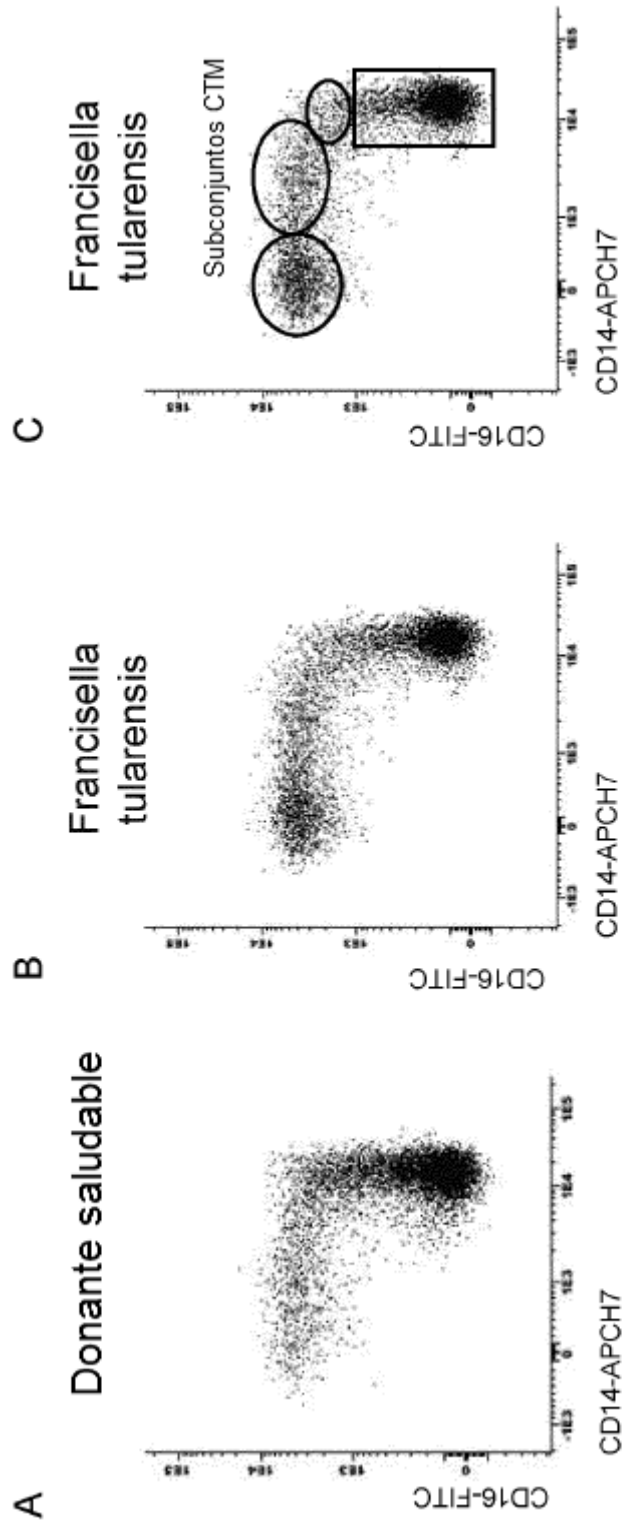


Figura 2

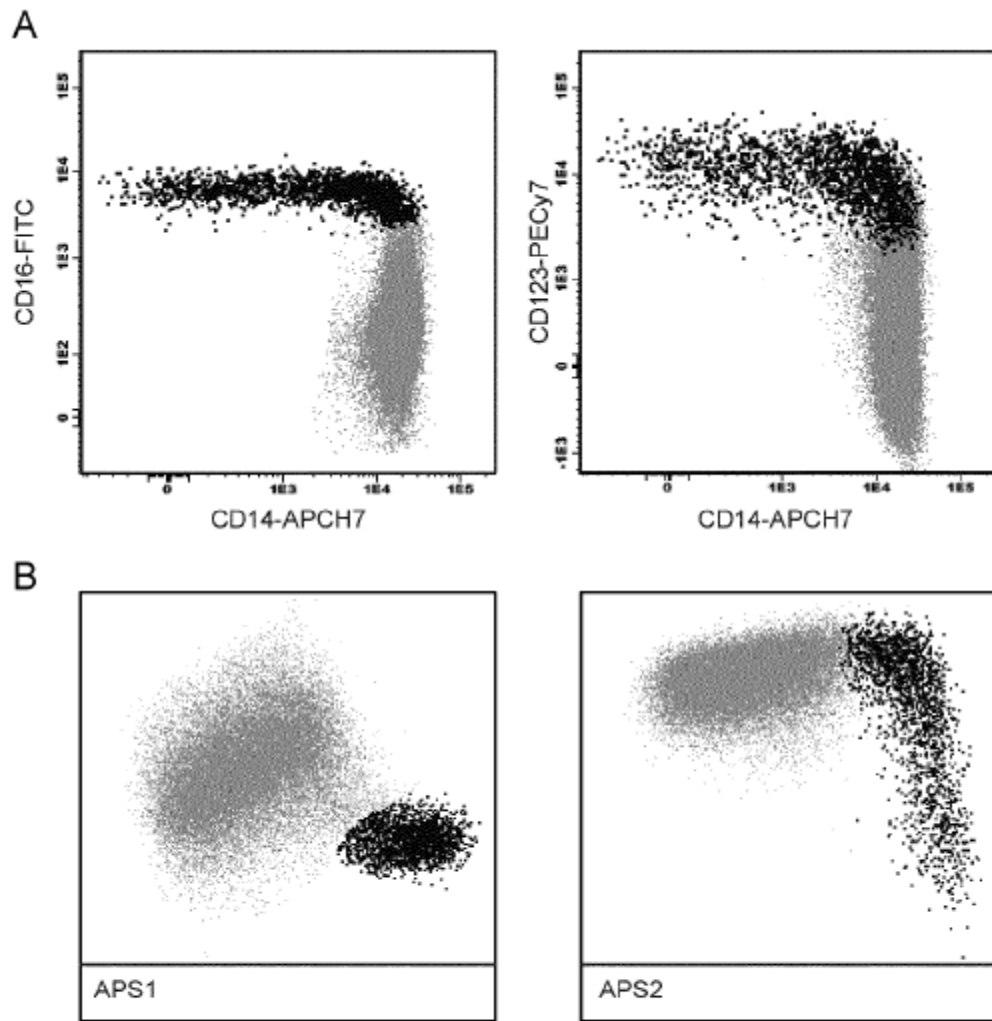


Figura 3

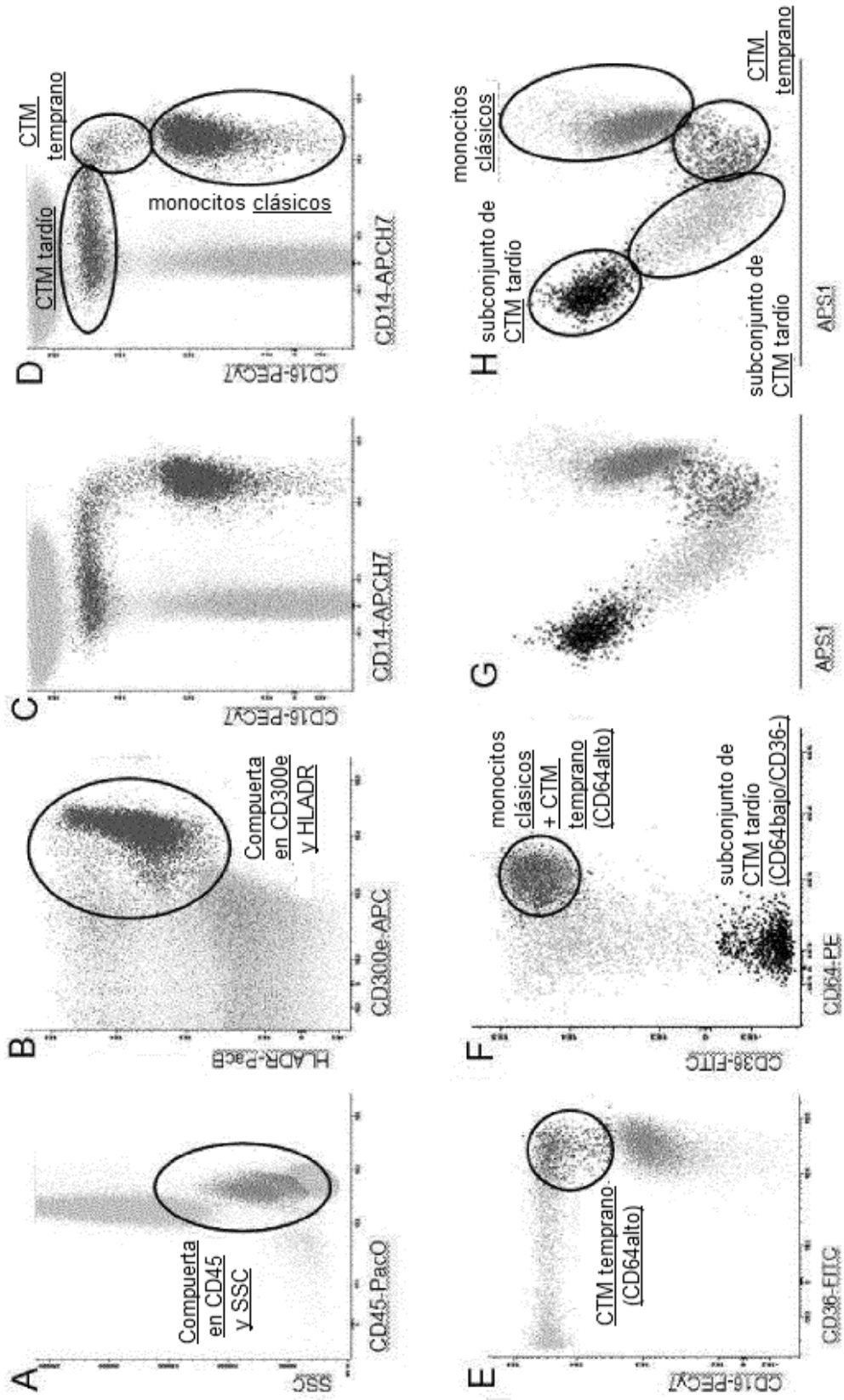


Figura 4

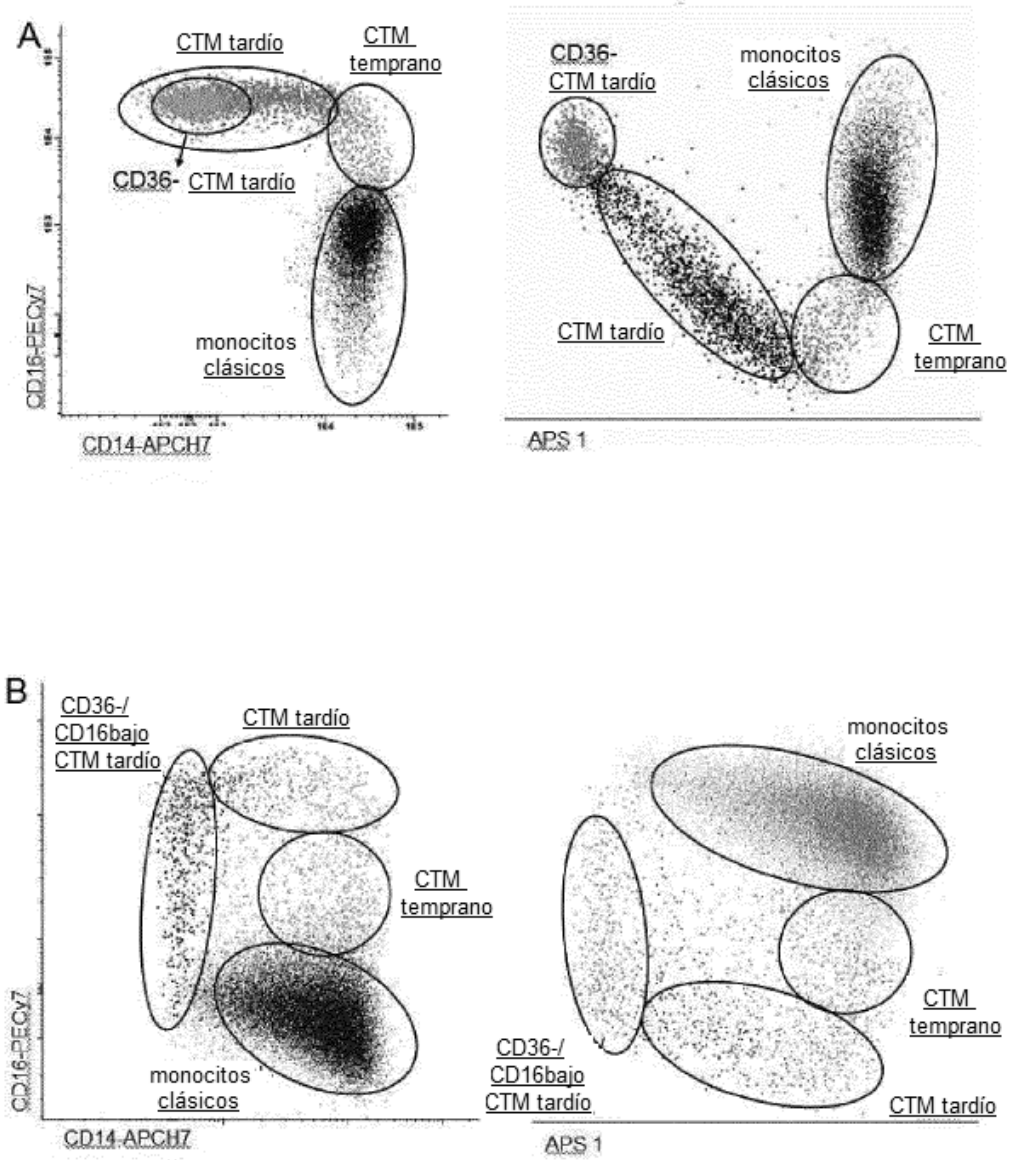


Figura 5

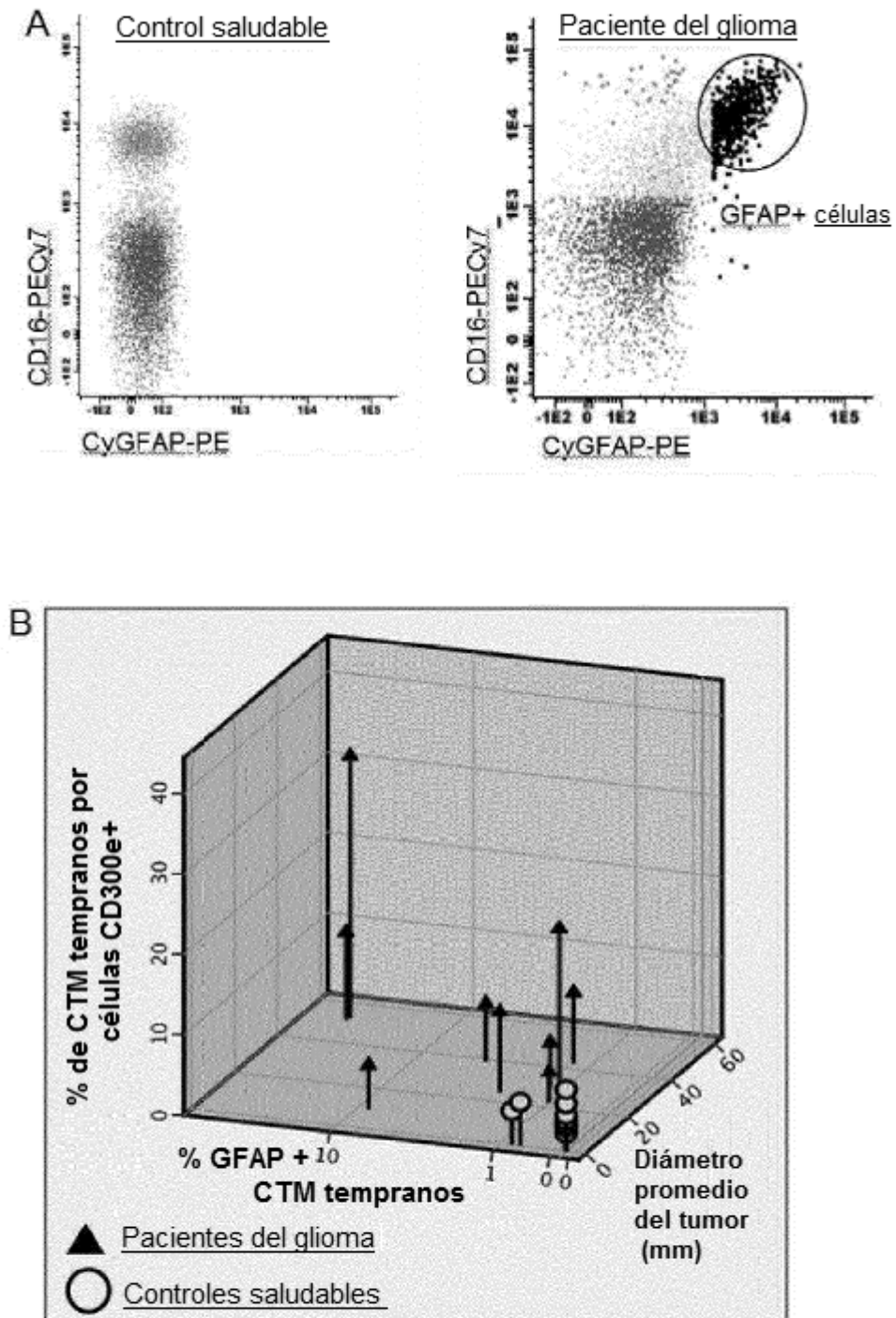


Figura 6

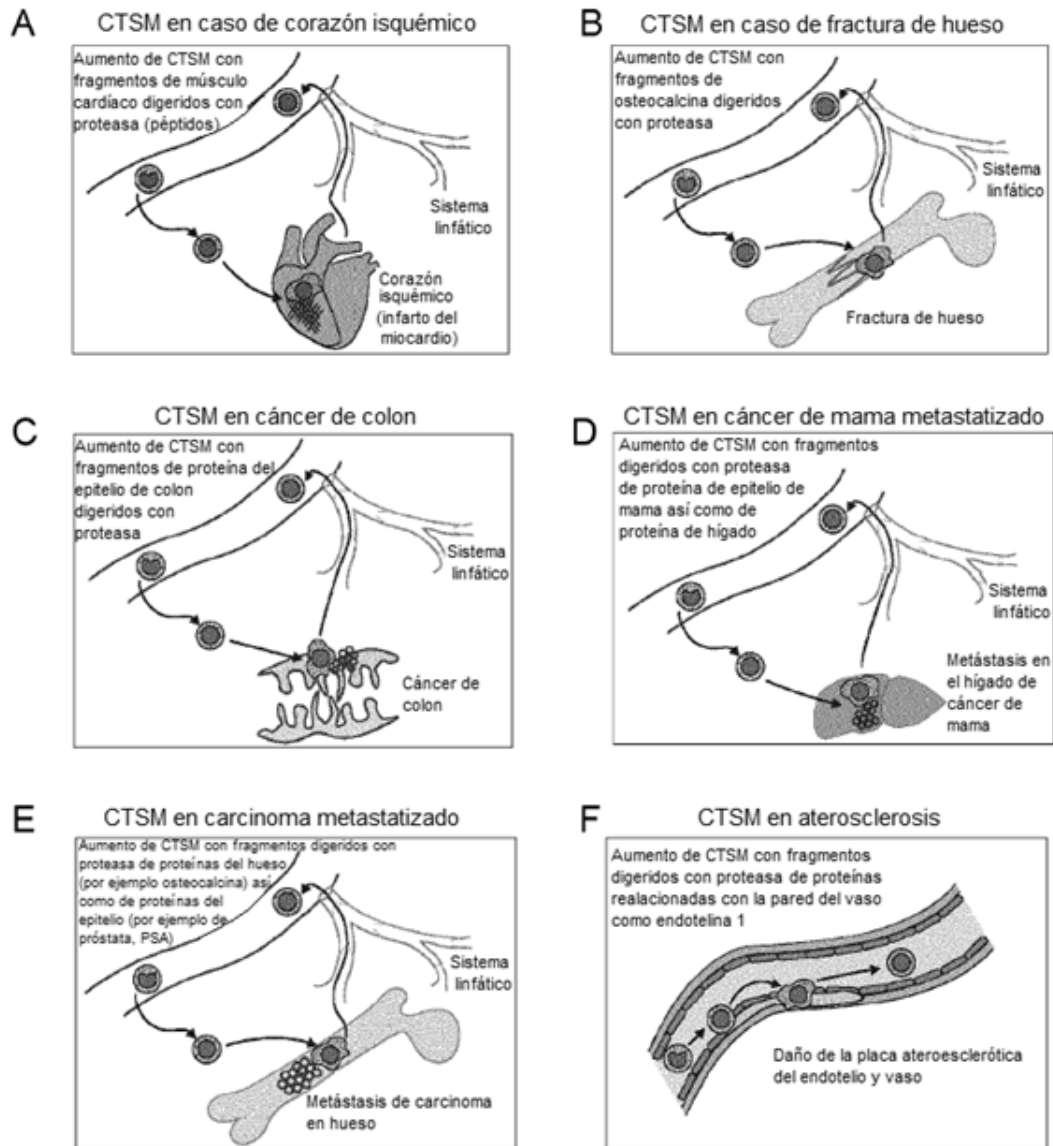


Figura 7

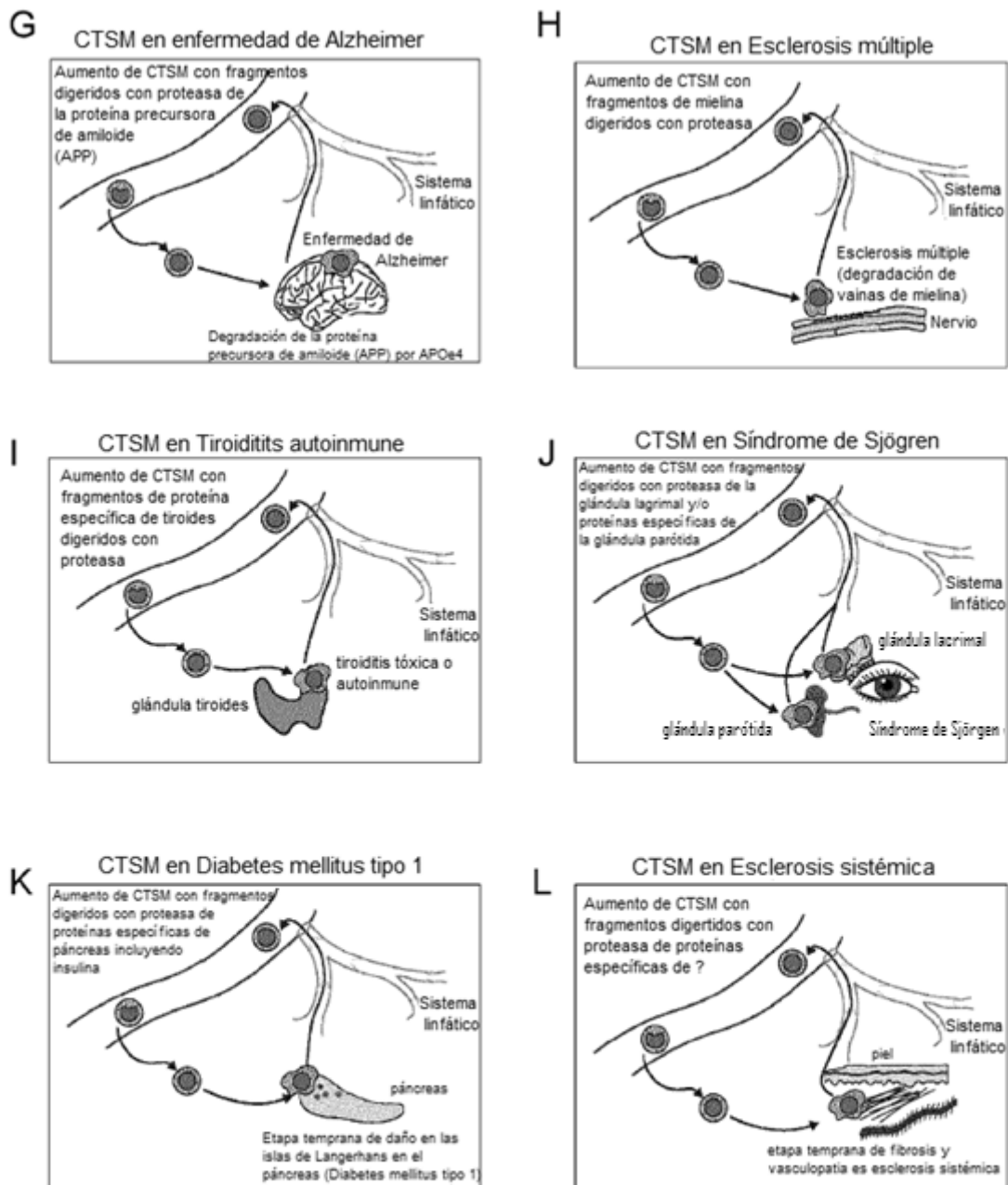


Figura 7

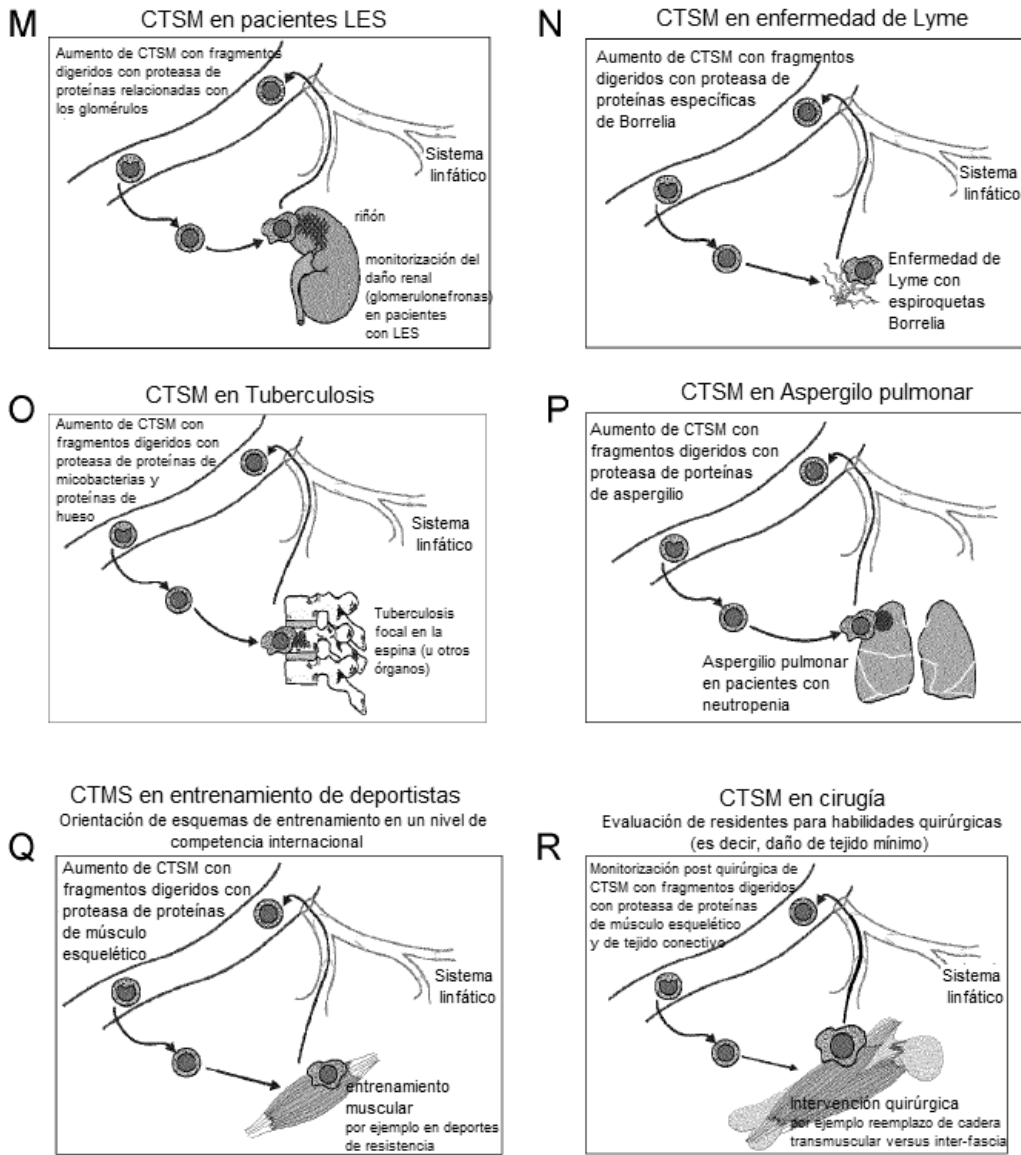


Figura 7