

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 999**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2014 PCT/DE2014/000214**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014 WO14169896**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2014 E 14734721 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2986985**

54 Título: **Método automatizable para la identificación, cuantificación y discriminación de señales específicas frente a señales no específicas en métodos de detección que utilizan un detector**

30 Prioridad:
19.04.2013 DE 102013006714

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2018

73 Titular/es:
**ZYAGNUM AG (100.0%)
Lyoner Straße 20
60528 Frankfurt am Main, DE**

72 Inventor/es:
COY, JOHANNES F.

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 664 999 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

Método automatizable para la identificación, cuantificación y discriminación de señales específicas frente a señales no específicas en métodos de detección que utilizan un detector

5 La invención refiere a un método para la identificación, cuantificación y discriminación de señales específicas frente a señales no específicas ("señales de fondo") en un método de detección que se aplica sobre material de muestra (obtenido previamente) con el uso de al menos un detector para el descubrimiento y la identificación (para la detección) de ciertas estructuras blanco, en donde el detector libera (emite) o genera (p. ej., por medio de reacciones enzimáticas) señales para su detección (es decir, para la detección del detector) y estas señales permiten una cuantificación del detector, y en donde las señales específicas son aquellas que el detector libera (emite) o genera como resultado del descubrimiento y la identificación de la estructura blanco. La detección de enfermedades u otras condiciones no deseadas se puede efectuar mediante la detección de estructuras que son específicas de la enfermedad o condición no deseada en cuestión, p. ej., como causa o como epifenómeno de las mismas.

15 Los métodos para la detección (el descubrimiento y la identificación) de tales estructuras se basan, a menudo, en la interacción de la estructura que se pretende detectar con un detector. Un detector puede ser, por ejemplo, un anticuerpo que reconoce un epítipo de una proteína, o bien una sustancia detectora preparada inorgánicamente que interactúa específicamente de acuerdo con el principio de llave y cerradura con la estructura que se pretende detectar y, así, la torna detectable.

20 Un factor decisivo para la calidad de tales métodos de detección es la especificidad con la que el detector reconoce la estructura. Cuanto mayor es la especificidad, mejor se puede discriminar entre un resultado positivo del método de análisis y uno negativo.

25 Toda interacción entre el detector y la estructura que se pretende detectar se caracteriza por cierto grado de especificidad. Cuanto mayor es la especificidad de esta interacción, menor es la tasa de detección no específica. Sin embargo, incluso si la especificidad es muy alta, pueden producirse interacciones no específicas entre el detector y la estructura que dan lugar a falsos positivos entre los resultados del análisis. Esta interacción no específica puede deberse a la parte del detector que interactúa directamente con la estructura, o bien deberse a los componentes del detector que no interactúan directamente con la estructura.

30 En los métodos de análisis en los que se usa, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal para la detección de cierto epítipo de una proteína determinada sobre una célula o dentro de ella (p. ej., una célula tumoral), el resultado total se compone de la señal específica, que proviene de la unión específica de la región variable del anticuerpo con el epítipo de la proteína que se pretende detectar, y señales no específicas. Las señales no específicas provienen, por ejemplo, de interacciones de la región variable del anticuerpo con epítopos similares de otras proteínas o de las interacciones de la región constante del anticuerpo con estructuras de la célula, p. ej., con receptores.

35 Si se usan tinturas fluorescentes para marcar y visualizar el detector, existe el problema de que muchas células exhiben una fluorescencia intrínseca que, además, puede variar en función de la longitud de onda de la luz con que se excitan. Esta fluorescencia intrínseca de las células también falsifica la señal detectada total.

40 Otra fuente de señales no específicas consiste en la unión no específica (adhesividad) de los anticuerpos a otras estructuras celulares o —en el caso del marcado intracelular— en que los anticuerpos libres no se quitan por completo del citoplasma luego del lavado.

45 Para determinar la magnitud de la unión no específica y otras señales no específicas, siempre se deben realizar controles.

50 Una forma de determinar las señales no específicas consiste en realizar un procedimiento de análisis en paralelo sin la adición del anticuerpo que reconoce el antígeno blanco (la estructura blanco). Esto es lo que se conoce como un control de fluorescencia menos uno (FMO).

55 Con el control FMO, se capturan las señales no específicas creadas por la fluorescencia intrínseca de la célula y/o por la fluorescencia no deseada (las emisiones secundarias no deseadas) de las tinturas usadas en el canal blanco (es decir, en el canal de detección correspondiente a las longitudes de onda de la luz que emite el anticuerpo de detección unido al epítipo blanco o la estructura blanco).

60 Tales controles FMO se usan, a menudo, para tipos celulares no adhesivos, tales como, por ejemplo, las células T. Por medio de estos controles, se puede determinar, en el rango de la luz emitida por la tintura fluorescente usada para la detección del antígeno blanco, la fracción de la intensidad lumínica que también está o estaría presente en ausencia del anticuerpo de detección.

Otra forma de determinar las señales no específicas en el caso de los métodos de detección que utilizan anticuerpos de detección consiste en realizar lo que se conoce como un control de isotipo. Para ello, el método de detección se realiza en una preparación de control paralela con un isotipo del anticuerpo de detección, es decir, con un anticuerpo del mismo subtipo que el anticuerpo de detección específico, pero dirigido contra un antígeno o epítipo que no ocurre en el organismo que se estudia en el método de detección ni en las células del mismo.

Una señal creada por la adición del anticuerpo del control de isotipo es una señal no específica que se genera exclusivamente como consecuencia de la "adhesión" del anticuerpo a las estructuras celulares.

El control de isotipo, en particular, siempre se realiza cuando las células sobre las que se realiza el análisis (las que se analizan en búsqueda del antígeno blanco) son células de las llamadas "pegajosas", que son, por ejemplo, los monocitos, las células dendríticas o las células B.

Sin embargo, tanto el control FMO como el control de isotipo muestran únicamente una parte de la señal no específica total. El control FMO y el control de isotipo no se pueden realizar en la misma preparación y, por lo tanto, tampoco es posible una determinación precisa de todas las uniones no específicas.

En el método de detección de estructuras intracelulares con anticuerpos de detección u otros detectores, que se unen —y, por tanto, marcan— intracelularmente, también ocurre otro tipo de unión no específica, que es incluso más difícil de determinar que en el caso de la detección de estructuras en la superficie de las células.

Este problema, que ya ocurre en la detección de una única estructura intracelular, se torna incluso más grave si, por ejemplo, se deben detectar dos estructuras intracelulares simultáneamente.

En estos métodos, descritos como métodos de "tinción intracelular", se utiliza un *buffer* permeabilizante para generar, en la membrana celular, orificios a través de los cuales los detectores marcados (por ejemplo, los anticuerpos de detección) pueden ingresar a la célula. Los parámetros de permeabilización, es decir, la duración de la presencia de los orificios en la membrana celular y el tamaño de dichos orificios, se deben seleccionar de manera muy precisa y estrictamente limitada para evitar daños letales a la célula debidos, por ejemplo, al egreso de fluido citoplasmático con componentes celulares importantes, pero, a la vez, permitir que se introduzca suficiente anticuerpo en la célula y que los anticuerpos no unidos se puedan quitar de la célula nuevamente, mediante un procedimiento de lavado, luego de un tiempo de unión suficiente.

En el caso de los detectores con marcado fluorescente, particularmente los anticuerpos de detección con marcado fluorescente, el análisis de tal tinción generalmente se realiza por medio de citometría de flujo o microscopía de fluorescencia. En estos, la fluorescencia (y, por ende, la presencia del anticuerpo o detector) se determina independientemente de que el anticuerpo/detector se haya unido a la estructura blanco (el epítipo). En otras palabras, lo que se evalúa es la mera presencia del detector/anticuerpo por la fluorescencia que emite como señal positiva, independientemente de su unión a la estructura blanco. No existe discriminación entre los detectores/anticuerpos que se han unido a la estructura blanco y los que están libres en el citoplasma o se han unido de manera no específica. Los detectores/anticuerpos libres o unidos de manera no específica contribuyen sustancialmente a la magnitud de las señales no específicas, dado que, en el caso de la tinción intracelular (por oposición a la tinción de las estructuras de las superficies celulares o secciones de tejido), no es posible efectuar un lavado eficiente para romper siquiera las uniones débiles y no específicas y para quitar sustancialmente de la célula los detectores/anticuerpos no unidos.

Por todos los motivos mencionados, la señal de fluorescencia detectada de un detector/anticuerpo intracelular es siempre una mezcla de señales específicas y no específicas. Actualmente, no es posible determinar cuán grande es la proporción de señales no específicas, dado que no es posible discriminar entre las señales específicas y las no específicas.

Ya se han divulgado métodos para la identificación, cuantificación y discriminación de señales específicas frente a señales no específicas (Alexander Hahn et al, 1992, Stherschantz et al, 2004, Phipps Richard P et al US 2012/015001 A1, Xiuzhu Wang et al, 2006; y Spence MM et al., 2004). Estos métodos usan detectores (p. ej., anticuerpos) para ubicar e identificar estructuras blanco específicas en material de muestra. El detector genera y emite señales que se pueden detectar y cuantificar, siendo las señales específicas aquellas que el detector emite o genera por haber ubicado e identificado la estructura blanco. Estos métodos consisten en la preparación real y al menos una preparación de control. La preparación de control contiene los mismos componentes en las mismas cantidades que la preparación real de análisis que se realiza en paralelo, pero difiere de la preparación real en que el/los dominio(s) de unión del/de los detector(es) está(n) bloqueado(s), por ejemplo, con péptidos específicos. La totalidad de las señales medidas en la preparación de control se resta de la totalidad de las señales medidas en la preparación real y la diferencia así obtenida representa la señal específica del/de los detector(es) de la(s) estructura(s) blanco que se pretende detectar.

Estos métodos se pueden usar con distintas técnicas de medición, pero no con citometría de flujo. Un estudio de 2008 (Sabine Plöttner et al., 2008) divulga un método basado en la citometría de flujo en el que las señales de fondo de la unión no específica interfieren con las señales específicas. En el estudio, se realizó una corrección basada en otros marcadores como ensayos de control. Sin embargo, no fue posible eliminar por completo la fluorescencia no

específica. Así, hasta el momento, se desconoce un método que mejore el cociente entre la intensidad de la señal y la intensidad de la señal de fondo mediante el uso de citometría de flujo.

5 El objetivo de la presente invención es mejorar los métodos de detección que se basan en la interacción entre el detector y la estructura blanco, lo que tiene como consecuencia que las interacciones específicas entre el detector y la estructura blanco se pueden determinar con mayor precisión, dado que las señales (resultados del análisis) positivas específicas se pueden discriminar en forma más simple y confiable de las señales (resultados del análisis) no específicas.

10 Una solución a este problema consiste en proveer un método de la naturaleza mencionada inicialmente que se caracteriza por que (i) se proveen al menos una preparación real de análisis y al menos una preparación de control, que se procesan en paralelo; (ii) la preparación de control contiene los mismos componentes en las mismas cantidades que la preparación real de análisis que se procesa en paralelo y difiere de dicha preparación real de análisis (preferentemente, siendo esta la única diferencia entre ambas) en que el/los dominio(s) de unión del/de los detector(es) está(n) bloqueado(s), preferentemente por una sustancia (un material, un agente) que es similar a la estructura blanco; y (iii) la totalidad (o la suma) de las señales medidas en la preparación de control se resta de la totalidad (o la suma) de las señales medidas en la preparación real de análisis, en donde la diferencia entre ambas representa la señal específica del/de los detector(es) de la(s) estructura(s) blanco que se pretende detectar, en donde el análisis de detección es un análisis citométrico de flujo y se realiza por citometría de flujo (en otras palabras, la señal específica del detector se calcula por medio de una medición comparativa entre el detector bloqueado y el no bloqueado).

15 En otras palabras, la solución de este problema consiste en (i) realizar un experimento paralelo, en el que antes de su uso el detector se bloquea con la estructura por reconocer; y (ii) comparar el resultado del análisis que se genera con el detector bloqueado (el "valor de control") con el resultado del análisis que se genera con el detector no bloqueado (el "valor de análisis"); y (iii) en que la diferencia entre ambos valores (el valor de análisis menos el valor de control) arroja un valor que representa la unión específica del detector a la estructura blanco o al sustrato que se pretende reconocer.

20 Pueden usarse como detectores, en particular, anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales.

30 Si se utiliza un anticuerpo monoclonal como detector, para su uso en la preparación de control, se puede bloquear el dominio de unión de este "anticuerpo de detección" con un péptido que corresponde a su epítipo blanco, de manera que ya no pueda unirse al epítipo blanco en el material de muestra. En otras palabras: en el caso de los anticuerpos de detección, sus dominios de unión específicos se pueden saturar con un "péptido bloqueador" de manera que ya no puedan unirse al epítipo blanco (en la muestra de la preparación de control) y, por lo tanto, ya no sea posible la detección de dicho epítipo.

35 Especialmente apto como tal "péptido bloqueador" es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la estructura blanco, o sea, en este caso, el epítipo blanco (es decir, que incluye por completo o casi por completo esta secuencia de aminoácidos o consiste en dicha secuencia).

40 También se pueden usar como "péptido bloqueador": (i) péptidos o fragmentos de proteína que tengan el epítipo blanco (la secuencia de aminoácidos de la estructura blanco) (es decir, que consistan en ella o la incluyan); (ii) proteínas enteras que tengan (incluyan) el epítipo blanco (la secuencia de aminoácidos de la estructura blanco); (iii) uno o más competidores peptídicos que sean similares en función y acción a los péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos del epítipo blanco (es decir, que consistan en ella o la incluyan) y que se unan al/a los dominio(s) de unión del/de los "anticuerpo(s) de detección"; o bien (iv) una combinación de uno o más competidores peptídicos y/o fragmentos de proteína, en donde cada competidor peptídico sea similar en función y acción al péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la estructura blanco y cada fragmento de proteína o competidor peptídico incluya la estructura blanco.

En el contexto de la presente invención, los siguientes términos tienen el significado que se indica en cada caso:

Detección = descubrimiento/reconocimiento y visualización

55 Dominio de unión = región del detector (p. ej., el anticuerpo) que se une a la estructura blanco (p. ej., cierto epítipo de la proteína que se pretende detectar).

Detector = material/sustancia/agente que reconoce de manera específica una estructura blanco e interactúa con esta estructura blanco en su dominio de unión (preferentemente, uniéndose a ella).

60 Anticuerpo de detección = un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal, que se utiliza como detector para el descubrimiento/reconocimiento de la estructura blanco y la unión a ella (aquí, en particular, a cierto epítipo de cierta proteína).

Péptido bloqueador = un péptido que bloquea el dominio de unión del anticuerpo de detección de manera que ya no pueda unirse al epítipo blanco.

Señal específica = señal que desprende (emite) el detector o el marcador unido a este detector cuando (tan pronto como) ha descubierto la estructura blanco y se ha unido a ella.

65 Preparación de análisis (sinónimo: "preparación real de análisis" = preparación (de una muestra) con un detector "apto para búsqueda y detección", cuyo dominio de unión a la estructura blanco no se ha bloqueado (previamente).

Preparación de control = preparación (de una muestra) con los mismos componentes en las mismas cantidades que la preparación (real) de análisis en la que, sin embargo, el detector, al añadirse a la preparación, tiene bloqueados sus dominios de unión a la estructura blanco (es decir, previamente se ha bloqueado específicamente este dominio de unión).

5 Con el método de la invención, se puede distinguir, de manera específica y extremadamente simple, entre las interacciones (uniones) específicas y no específicas del detector, y determinar cuáles de las señales del detector que se detectan son específicas y cuales son no específicas. Esto se asocia con un realce considerable del método de detección involucrado, lo que se traduce en una certidumbre considerablemente mayor en el diagnóstico.

10 En el caso de un anticuerpo de detección, con el método de la invención también se captura la unión no específica causada por la sección constante del anticuerpo de detección o por un anticuerpo secundario, y/o debida a tinturas o enzimas acopladas a los anticuerpos.

15 Asimismo, pueden existir diferencias dentro de un individuo en la magnitud de la unión no específica (es decir, diferencias dentro de un organismo), y las señales no específicas basadas en tales diferencias dentro de un individuo también se pueden reconocer y tomar en cuenta con el método de la invención. Por ejemplo, la mayor concentración de una proteína XY y la unión no específica del anticuerpo a esta proteína asociada con dicha mayor concentración puede dar lugar a un aumento considerable de la señal no específica. Si la concentración de esta proteína XY está
20 sujeta a fluctuaciones dentro del individuo, durante el uso de los métodos de análisis convencionales con preparaciones de control, en los que las muestras provienen de un organismo o individuo saludable B, esto puede dar lugar a resultados falsos, dado que una señal más intensa en la preparación de análisis con muestras del individuo A en comparación con la preparación de control con muestras del individuo B se evalúa como una señal específica y no se atribuye a una mayor señal no específica causada por la unión no específica de la proteína XY presente en mayor
25 concentración. Por ejemplo, las reacciones inmunológicas tales como la rinitis primaveral o una enfermedad gripal pueden hacer que aumente la cantidad de ciertas células inmunes en la sangre, por lo que el/los anticuerpo(s) de detección entra(n) en contacto con tales células pegajosas (p. ej., los macrófagos) en mayor medida y tiene(n) uniones no específicas con ellos, lo que produce un aumento de la proporción de señales no específicas en el individuo.

30 Con el método de la invención, estas señales no específicas también se capturan en los experimentos paralelos con los anticuerpos de detección bloqueados (las "preparaciones de control"). Al restar el valor total medido de señales no específicas en estas preparaciones de control del valor total medido de estas señales en las preparaciones reales de análisis, se calcula el valor medido de señales específicas y se determina individualmente la magnitud de la unión específica. La especificidad del método de detección relevante se puede aumentar marcadamente, particularmente
35 en el caso de las señales específicas débiles o los tipos celulares con baja abundancia (p. ej., las células tumorales).

Las realizaciones preferentes del método de la divulgación consisten en que el análisis de detección es un método de análisis citométrico de flujo y se realiza por citometría de flujo o en que el análisis de detección es un análisis microscópico de fluorescencia y se realiza por microscopía de fluorescencia, o bien en que el método de detección es
40 una combinación de métodos de análisis citométricos de flujo y microscópicos de fluorescencia y se realiza por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

Con la introducción de esta medición de control en los métodos de detección, particularmente en métodos de detección inmunohistoquímicos e inmunocitológicos conocidos que utilizan microscopía de fluorescencia y/o citometría de flujo
45 como método analítico, estos se pueden realizar de manera más confiable y segura. La evaluación de los resultados de los análisis se simplifica considerablemente porque las dos mediciones de la preparación (real) de análisis y de la preparación de control se pueden comparar directamente entre ellas o restarse una de la otra. Además, se puede aumentar enormemente la sensibilidad del análisis en cuestión, dado que la medición de las señales de fondo (unión no específica) en la preparación de control y la resta de dichos valores medidos de los valores medidos con la
50 preparación real de análisis permiten calcular la señal específica, lo cual, en la práctica, mejora el cociente entre la intensidad de la señal y la intensidad de la señal de fondo.

Así, por ejemplo, también se pueden determinar de manera simple y eficiente las células presentes en la sangre en
bajas cantidades (p. ej., las células tumorales circulantes o las células inmunes particularmente poco abundantes).
55 Los monocitos y los macrófagos también se pueden detectar y analizar considerablemente mejor, dado que la proporción de señales no específicas se puede determinar y estas señales no específicas se pueden restar de la señal total.

En el caso de las muestras que provienen (supuestamente) de organismos donantes enfermos (pacientes) y, en particular, cuando ya se puede suponer tempranamente que la magnitud de las señales no específicas será bastante alta, y/o las señales no específicas fluctúan entre individuos y/o se ven/han visto afectadas por cambios en el organismo donante, en particular en su sistema inmune (por ejemplo, como consecuencia de un resfrío, una rinitis primaveral o el uso de cortisona), el uso del método de la invención ofrece ventajas considerables: dado que estas
60 señales no específicas se capturan y miden por separado, y que el valor medido de la/cada señal específica se puede calcular con gran precisión sobre la base de estos valores medidos, los resultados del método de detección —así como los diagnósticos basados en ellos— son más exactos, seguros y confiables.
65

En el caso de los métodos de detección inmunocitológicos con tinción intracelular, resulta la siguiente situación con el método de detección de la divulgación:

5 Luego de la generación temporal de orificios en la membrana celular, la introducción en la célula del anticuerpo con tinción fluorescente bloqueado con péptidos, el lavado y el cierre de los poros, parte del anticuerpo de detección marcado fluorescentemente permanece dentro de la célula (parte de él libre pero no lavada y parte unida de manera no específica). Las señales que emite indican la magnitud de la unión no específica.

10 En paralelo con ello, el anticuerpo teñido fluorescentemente pero no bloqueado se usa en un experimento que, por lo demás, es idéntico. Por medio de la unión específica del anticuerpo al epítipo blanco, se crea entre el anticuerpo y el epítipo blanco una unión firme, que no se rompe por lavado ni por difusión. Por otro lado, también ocurre, en este caso, una unión no específica del anticuerpo a las estructuras celulares, de manera que se generan señales no específicas.

15 Sin embargo, debido a la unión específica del anticuerpo y el hecho de que el lavado extrae dicho anticuerpo de la célula con menor intensidad, la señal total es mayor que en la medición paralela con el anticuerpo bloqueado. La señal de la medición paralela en la preparación de control con el anticuerpo bloqueado ("medición de control") se resta de la señal total de la medición de la preparación de análisis con el anticuerpo no bloqueado ("preparación de análisis") y únicamente los valores medidos restantes se deben evaluar como señales de medición específicas.

20 En el caso de los métodos de detección inmunohistoquímicos e inmunocitológicos, resulta la siguiente situación con el método de detección de la divulgación:

25 De acuerdo con la divulgación, en los métodos de detección inmunohistoquímicos e inmunocitológicos se realiza, como control o análisis de control, en paralelo con las preparaciones reales de análisis, en las que se utilizan anticuerpos de detección con dominios de unión libres (es decir, no ocupados ni bloqueados), una medición comparativa sobre (al menos) una preparación de control, que difiere de la correspondiente preparación paralela "real" de análisis (preferentemente, siendo esta la única diferencia entre ambas) en que el dominio de detección del/de cada anticuerpo de detección está unido o saturado con un péptido o un competidor de acción comparable (es decir, con la misma función y acción o con una acción similar), de manera que se evita una unión específica del anticuerpo a "su" epítipo en la estructura blanco (el sujeto del análisis). La medición de las señales del anticuerpo en esta preparación de control y la comparación de las mismas con las señales medidas del anticuerpo en la preparación real de análisis permiten determinar las señales específicas y no específicas del método de análisis particular: la señal total de la preparación real de análisis menos (luego de restar) las señales no específicas en la preparación de control arroja el valor de la señal específica de la estructura blanco, que es el sujeto del análisis.

35 Aunque se sabe que en los métodos de detección inmunohistológicos con anticuerpos como detectores se pueden discriminar las señales no específicas de las señales específicas "bloqueando" el anticuerpo (p. ej., con un péptido), la prueba inmunológica no se realiza luego con preparaciones paralelas de control y de prueba (preparación de prueba con anticuerpo no bloqueado y preparación de control con anticuerpo bloqueado). Por lo tanto, no se determina un valor medido de las señales no específicas y no se realiza una determinación de la diferencia para el cálculo del valor medido de las señales específicas (valor de señal específico). En su lugar, se realizan únicamente mediciones sobre preparaciones de prueba con anticuerpos no bloqueados y, por ende, los resultados obtenidos en la forma de señales medidas de los anticuerpos siempre representan la mezcla de señales de anticuerpos unidos específicamente y anticuerpos unidos no específicamente.

45 El método de acuerdo con la invención también se puede combinar sin dificultad con métodos de evaluación parcial o completamente automáticos. En el estado de la técnica, no solo con citometría de flujo sino actualmente también, a menudo, con inmunohistoquímica, los resultados de los métodos de detección con tinción inmunohistoquímica se capturan y evalúan digitalmente. Con el uso del método de la invención con determinación paralela de la señal no específica, también es posible realizar digitalmente una comparación directa de las dos tinciones de la preparación real de análisis y la preparación de control del/de cada preparación real de análisis, es decir, la diferencia entre los resultados del/de cada preparación real de análisis y los del/de cada preparación de control se puede determinar con programas de evaluación digitales, lo que facilita y acelera aún más el análisis de las muestras histoquímicas en general y, a la vez, resulta más confiable y seguro.

50 Las realizaciones preferentes del método de la invención también consisten, por lo tanto, en que la detección de las señales de reacción en la preparación de control (RS-C) y la preparación real de análisis (RS-T) y/o la resta (RS-T menos RS-C) y la visualización de la diferencia se realiza de manera parcial o totalmente automática.

60 Si la prueba de detección es una prueba inmunohistoquímica, los resultados de la prueba, es decir, los resultados de la tinción inmunohistoquímica, se capturan y evalúan digitalmente, es decir, la detección de las señales de reacción en la preparación de control (RS-C) y la preparación real de análisis (RS-T) se realiza digitalmente, la resta (RS-T menos RS-C) se realiza de manera parcial o totalmente automática y la visualización de la diferencia se realiza digitalmente.

65

Si la prueba de detección es una prueba de inmunofluorescencia, los resultados de la prueba, es decir, los resultados de inmunofluorescencia, se capturan y evalúan digitalmente, es decir, la detección de las señales de emisión en la preparación de control (RS-C) y la preparación real de análisis (RS-T) se realiza digitalmente, la resta (RS-T menos RS-C) se realiza de manera parcial o totalmente automática y la visualización de la diferencia se realiza digitalmente.

La invención y la divulgación se explican en mayor detalle a continuación sobre la base de ejemplos prácticos y diagramas asociados.

Los diagramas muestran:

Fig.1: Estrategia de separación ("gating strategy") para la identificación de los macrófagos

a) Para la identificación de los monocitos (indicados aquí con la leyenda "monos"), se grafican todos los leucocitos en términos de su granularidad (SSC-A) y su tamaño (FSC-H).

b) Únicamente las células así caracterizadas se analizan para detectar la presencia del marcador de superficie CD14. Estas incluyen tanto las células más brillantes (es decir, altamente positivas), en la nube superior ovalada de puntos, como las de brillo intermedio (normalmente positivas). Se define una región (rotulada como "CD14") alrededor de estas células para su posterior caracterización.

c) Esta región se analiza a su vez para detectar la presencia del marcador de superficie CD16. Estas incluyen tanto las células más brillantes (es decir, altamente positivas), en la nube superior ovalada de puntos, como las de brillo intermedio (normalmente positivas). Análogamente, se define una región (rotulada como "CD16") alrededor de estas células para su posterior caracterización.

d) Todas las células identificadas como "monos" y también como "CD14" se analizan a su vez para detectar la presencia intracelular del anticuerpo Apo10 con el fin de optimizar la estimación del corte subjetivo.

e) Las células contenidas en la región "monos" y también en la región "CD14" que, además, llevan el marcador de superficie CD16, cuentan como "macrófagos auténticos". Las células se separan por el corte horizontal y, de esa manera, se identifican como "células Apo10-positivas" (CD14-positivas, CD16-positivas, Apo10-positivas).

Como resultado de la medición, el valor de "detección del epítipo en monocitos/macrófagos" (EDIM, por sus siglas en inglés) se muestra como la cantidad relativa de macrófagos CD14-positivos/CD16-positivos (CD14+/CD16+) que también son Apo10-positivos (en relación con la cantidad total de macrófagos CD14+/CD16+).

Fig.2: Determinación del corte en una muestra de sangre

a) Tinción EDIM con anticuerpo Apo10 (FITC)

La proporción de macrófagos Apo10-positivos (Apo10-positivos, CD14-positivos y CD16-positivos) en la imagen de la derecha (puntos de señal rojos), es decir, de macrófagos que emiten una señal leve en el canal de medición FITC, se encuentra 16,7 % por encima del corte horizontal (frontera de separación).

En la imagen de la izquierda, se pueden ver los monocitos que no se interpretan aquí en mayor detalle. Esto se aplica también a los siguientes diagramas.

b) Tinción EDIM con anticuerpo TKTL1 (PE)

La proporción de macrófagos TKTL1-positivos (TKTL1-positivos, CD14-positivos y CD16-positivos) en la imagen de la derecha (puntos de señal rojos), es decir, de macrófagos que emiten una señal leve en el canal de medición FITC, se encuentra 17,2 % por encima del corte horizontal (frontera de separación).

Fig.3: Relación entre la medición y el control FMO con una muestra de sangre

a) Tinción individual con anticuerpo Apo10 (FITC)

La proporción de macrófagos Apo10-positivos (Apo10-positivos, CD14-positivos y CD16-positivos) en la imagen de la derecha (puntos de señal rojos), es decir, de macrófagos que emiten una señal leve en el canal de medición FITC, se encuentra 16,7 % por encima del corte horizontal (frontera de separación).

b) Control FMO (sin anticuerpo FITC)

La proporción de macrófagos positivos en la imagen de la derecha (marcados en rojo) se encuentra claramente distanciada de la nube de macrófagos no teñidos, apenas 0,8 % por encima del corte horizontal. El corte se transfirió de la medición (a) a la medición del control FMO. Esto también se aplica a los siguientes diagramas de control FMO.

Fig.4: Curva de titulación

Tinción de sangre de paciente con una concentración molar de péptido entre 1 y 1000 veces mayor que la de anticuerpo Apo10. En el eje x se muestra la concentración de péptido (exceso molar de péptido frente al anticuerpo) y en el eje y se muestra el valor relativo de los macrófagos Apo10-positivos por encima del corte (en %).

Fig.5: Medición paralela con el anticuerpo Apo10 bloqueado y no bloqueado

a) Preparación de control con 10 veces de exceso de péptido bloqueador.

b) Preparación de control con 500 veces de exceso de péptido bloqueador.

Fig.6: Diagrama esquemático del análisis de citometría de flujo de dos células con señal Apo10 (fluorescencia) de diferente intensidad

El eje X muestra la señal CD16; el eje Y muestra la señal Apo10.

A) Células con el anticuerpo Apo10 no bloqueado.

B) Células con el anticuerpo Apo10 bloqueado.

Fig.7: Diagrama esquemático del análisis por citometría de flujo de dos células con señal Apo10 (fluorescencia) de diferente intensidad y representación de la magnitud de la reducción en la señal Apo10

5 El eje X muestra la señal CD16; el eje Y muestra la señal Apo10.

A) Células con el anticuerpo Apo10 no bloqueado.

B) Células con el anticuerpo Apo10 bloqueado. La longitud de las flechas (hacia abajo) corresponde con la magnitud de la disminución en la señal Apo10 luego del bloqueo del anticuerpo.

10 Fig.8: Diagrama esquemático análogo a la Fig.6 y la Fig.7 para el análisis de la preparación ("real") de análisis y el control FMO

A) Células del control FMO (sin adición del anticuerpo Apo10).

B) Células de la preparación ("real") de análisis luego de su incubación y tinción (marcado) con el anticuerpo Apo10 marcado fluorescentemente.

15 Fig.9: Diagrama de la Figura 8 con el corte ubicado

A) Células del control FMO (sin adición del anticuerpo Apo10).

B) Células de la preparación ("real") de análisis luego de su incubación y tinción (marcado) con el anticuerpo Apo10 marcado fluorescentemente. La línea de trazos marca el corte sobre la nube de células del control FMO.

20 Fig.10: Diagrama esquemático del análisis por citometría de flujo de las células luego de su incubación con anticuerpo Apo10 marcado fluorescentemente (preparación "real" de análisis) y las células de un control FMO

25 Las células que llevan el antígeno Apo10 se indican con un círculo con un triángulo en su interior (▲). Las células que llevan el antígeno Apo10 y están marcadas con el anticuerpo Apo10 marcado fluorescentemente y emiten las correspondientes señales de fluorescencia se muestran aquí, cada una, con un círculo con un cuadrado en su interior (■).

A) Valores medidos del control FMO (sin adición del anticuerpo Apo10). Las células positivas para el antígeno Apo10 (círculo con triángulo) están presentes pero no se detectan.

30 B) Células luego de su incubación y tinción (marcado) con el anticuerpo Apo10 marcado fluorescentemente. Las células positivas para el antígeno Apo10 ahora son teñidas por el anticuerpo Apo10 unido (círculo con triángulo). Los dos círculos con triángulo (▲) que se muestran aquí indican la posición anterior de las dos células que llevan el antígeno Apo10 de acuerdo con la Fig.10 A.

35 Fig.11: Diagrama de acuerdo con la Fig.10 con el corte ubicado

A) Células del control FMO (sin adición del anticuerpo Apo10).

B) Células de la preparación ("real") de análisis luego de su incubación y tinción (marcado) con el anticuerpo Apo10 marcado fluorescentemente.

40 Fig.12: Secciones de tejido de un carcinoma de la cavidad bucal tras su incubación con el anticuerpo de detección Apo10 para la identificación de células tumorales que tienen una proporción elevada de proteína DNasaX con el epítipo Apo10 en el núcleo celular

a) Tinción con anticuerpo Apo10 no bloqueado.

b) Tinción con anticuerpo Apo10 bloqueado con el epítipo blanco/péptido blanco.

45 Ejemplos

Ejemplo comparativo 1: Uso del método de la divulgación sobre una muestra de sangre

Para el análisis de una muestra, p. ej. una muestra de sangre (de un paciente), se requieren al menos dos preparaciones paralelas o mediciones paralelas: al menos una "preparación real de análisis" y al menos una "preparación de control".

50 Estas dos preparaciones difieren únicamente en que, en la "preparación de control", el/los dominio(s) de unión del/de los anticuerpo(s) de detección está(n) bloqueado(s), lo que no permite una unión específica.

55 A partir de la comparación de los resultados de la medición de ambas preparaciones, se puede determinar la magnitud de la unión no específica que proviene, por ejemplo, de la parte constante del anticuerpo de detección, de un anticuerpo secundario o de tinturas o enzimas acopladas a los anticuerpos.

60 En el caso de la tinción intracelular en inmunocitología mediante anticuerpos de detección de unión intracelular, con el método de la divulgación también se puede determinar la proporción de anticuerpos —así como la señal que deriva de los mismos— que no están unidos pero tampoco se han quitado de la célula mediante un lavado y, por ende, permanecen en forma no específica en la célula.

Con el método de la divulgación, también se puede determinar individualmente la variabilidad de la unión no específica o de la unión que en realidad se debe a las estructuras del anticuerpo, independientemente de los dominios de unión.

Así, por ejemplo, se puede determinar la magnitud de la unión de la parte constante del anticuerpo de detección a ciertas células inmunes que se han visto alteradas por una reacción inmunológica en el organismo y, a su vez, se pueden reconocer y eliminar tales señales falsas positivas.

5 Es cierto que, en ciertas circunstancias, el método de análisis de la divulgación se asocia con un mayor consumo de reactivos y material de prueba, dado que el volumen de muestra (muestras de tejido, sangre) se duplica debido a la preparación de control paralela. Sin embargo, este gasto adicional se ve compensado holgadamente por las señales extremadamente específicas, así como la mayor seguridad en el diagnóstico y la mayor sensibilidad asociadas con dichas señales específicas.

10 Ejemplo comparativo 2: Uso del método de la divulgación sobre una muestra de sección de tejido
Para el análisis de una muestra de sección de tejido (de un paciente), se requieren al menos dos preparaciones paralelas o mediciones paralelas: al menos una "preparación real de análisis" y al menos una "preparación de control".

15 La manipulación y el tratamiento de estas preparaciones se realiza como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 3: Prueba de detección con dos o más anticuerpos de detección

20 Por supuesto, la forma de las pruebas paralelas de acuerdo con la divulgación también se puede implementar con dos o más anticuerpos de detección bloqueados con las respectivas secuencias peptídicas blanco (u otras estructuras blanco). En este caso, la señal de la medición sin competencia peptídica se resta de la medición con competencia simultánea con varios péptidos para determinar la señal específica generada por la unión del/de los anticuerpo(s) con el dominio de unión.

Ejemplo 4: Uso del método de la invención con citometría de flujo

25 La citometría de flujo permite una determinación cuantitativa de las partículas marcadas fluorescentemente, particularmente las células marcadas fluorescentemente (clasificación de células activada por fluorescencia o "FACS").

30 Las células marcadas fluorescentemente pasan, con ayuda de un flujo líquido, por uno o más láseres, que irradian las células con la(s) longitud(es) de onda relevante(s). A consecuencia de ello, las células emiten luz de otra longitud de onda. La luz emitida es proporcional a la cantidad de anticuerpo ligado. Luego, los datos se transfieren a un programa de evaluación y se muestran en diagramas.

35 Las aplicaciones más frecuentes y simples de la citometría de flujo incluyen el análisis de las estructuras superficiales de células individuales, en donde estas estructuras superficiales se detectan mediante anticuerpos marcados fluorescentemente (llamados "anticuerpos de detección") que se unen a estas estructuras. Al igual que los epítomos de proteínas, los epítomos detectables de tales anticuerpos de detección también pueden ser otras estructuras, tales como estructuras de azúcares, grasas o modificaciones de proteínas, tales como grupos fosfato.

40 Otra aplicación de la FACS es la detección de moléculas intracelulares, tales como ADN y ARN, o de epítomos proteicos intracelulares. La señal específica que deriva de la estructura blanco se determina, como regla general, por comparación con células de control. A partir de ello, se pueden realizar afirmaciones, por ejemplo, sobre el ciclo celular y la apoptosis, o se pueden detectar ciertos tipos celulares, tales como células normales saludables, células tumorales o células tumorales malignas (células cancerosas).

45 Además de determinar la presencia de epítomos sobre las células y dentro de ellos, la citometría celular también permite determinar la presencia de estructuras en soluciones tales como el suero o el sobrenadante de un cultivo celular. Para ello, se equipan microesferas (u otros portadores) con uno o más anticuerpos marcados fluorescentemente y se las añade a la muestra por analizar, de manera que el/los antígeno(s) relevante(s) (p. ej. las interleucinas) de la muestra se unan al anticuerpo inmovilizado por las microesferas.

50 Ejemplo 5: Uso del método de la invención con citometría de flujo con los anticuerpos "Apo10" y "TKTL1" sobre muestras de sangre

Mediante el uso de citometría de flujo, se pretenden detectar estructuras intracelulares en células inmunes (células inmunes fagocitantes tales como los monocitos y los macrófagos).

55 Para ello, en primer lugar, se seleccionan anticuerpos que marcan específicamente la superficie (estructuras extracelulares) de las células inmunes que se pretende analizar, con el fin de identificar dichas células. En segundo lugar, se seleccionan anticuerpos que detectan las estructuras intracelulares de las células inmunes. Los anticuerpos "Apo10" y "TKTL1" están dirigidos contra epítomos intracelulares.

60 Los anticuerpos están acoplados con diferentes tinturas fluorescentes (fluoróforos) que, durante la citometría de flujo, se iluminan (emiten luz) de diferente manera tras ser excitados con luz láser y, de esta manera, se pueden identificar. Por medio de esta emisión, se puede hacer visible (monitorizar) la unión o presencia del anticuerpo sobre las células o dentro de ellas.

65

Para poder detectar estructuras internamente (de manera intracelular) en las células seleccionadas, se utiliza un *buffer* de permeabilización, que genera orificios en la membrana celular para introducir los anticuerpos en las células.

5 Para determinar la proporción de señales no específicas —que, en este caso, puede ser particularmente alta debido a la tinción intracelular de sangre del paciente con monocitos y macrófagos “pegajosos”—, se realizan experimentos paralelos (“preparaciones de control”) en los que, antes de su uso, los dominios de unión de los anticuerpos (de detección) “Apo10” y/o “TKTL1” se saturan, cada uno, con un “péptido bloqueador”, de manera que ya no pueden unirse a su epítipo blanco y, por consiguiente, ya no pueden detectar.

10 Los resultados del análisis que se generan con los anticuerpos (de detección) bloqueados (“valores de control”) se comparan con los resultados del análisis generados con los anticuerpos “Apo10” y/o “TKTL1” no bloqueados (“valores reales de análisis”). La diferencia entre ambos, es decir, los valores (reales) de análisis menos los valores de control, da un valor que representa la unión específica del anticuerpo “Apo10” o del anticuerpo “TKTL1” a la estructura blanco.

15 En este ejemplo, se utiliza como tal “péptido bloqueador”, en cada caso, el péptido usado para la inmunización de las células productoras de anticuerpos durante la generación del anticuerpo en cuestión y, en consecuencia, la secuencia de aminoácidos del mismo es idéntica a la secuencia de aminoácidos del epítipo blanco o muy similar a la misma.

A continuación, se describe la implementación del análisis:

20

Materiales y métodos

Kit: IntraPrep de Beckman Coulter (n.º A07803);

Anticuerpos: (excepto Apo10) de BD Biosciences, Heidelberg

Plan de procesamiento:

25

Tubo	FITC	PE	PerCP	APC
1 (FMO)			CD14 (n.º 345786)	CD16 (n.º 561304)
2 (tinción EDIM)			CD14 (n.º 345786)	CD16 (n.º 561304)
3 (bloqueo con péptido)			CD14 (n.º 345786)	CD16 (n.º 561304)

Protocolo de procesamiento:

30 Marcado de los tubos FACS (p. ej., tubos de base redondeada, 1000 x 5 ml de BD, n.º 352008); adición de los anticuerpos extracelulares correspondientes en la cantidad recomendada por el fabricante; adición de 100 µl de sangre entera con EDTA, mezclado;

Incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz; adición de 100 µl del reactivo Reagent 1 de IntraPrep por tubo y mezclado inmediato; incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz;

35 En paralelo, comenzamos con la coincubación del anticuerpo intracelular con péptido bloqueador (30 minutos a temperatura ambiente); primer lavado; adición de 4 ml de Cell Wash (BD, n.º 349524) a temperatura ambiente, centrifugación a 300 g (= 1400 rpm) durante 5 minutos, decantar bien el sobrenadante; resuspender cuidadosamente el sedimento sin crear burbujas con una pipeta; adición de 100 µl del reactivo Reagent 2 de Intraprep por tubo, ¡no agitar!; incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz, luego agitar brevemente; adición del anticuerpo intracelular correspondiente de acuerdo con el siguiente plan operativo:

40

Tubo	FITC	PE	PerCP	APC
1 (FMO)				
2 (tinción EDIM)	Apo10 (Tavartis)	TKTL1 (Tavartis)		
3 (bloqueo con péptido)	Apo10 (Tavartis)			

45 A continuación, incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz; adición de 4 ml de Cell Wash (BD, n.º 349524); centrifugación a 300 g (= 1400 rpm) durante 5 minutos; decantar bien el sobrenadante; tercer lavado; adición de 4 ml de Cell Wash (BD, n.º 349524); centrifugación a 300 g (= 1400 rpm) durante 5 minutos; decantar bien el sobrenadante; adición de 200 µl de Cell Wash (BD, n.º 349524); Ahora, las preparaciones están listas para realizar las mediciones y evaluaciones.

Implementación de la medición FACS

50 Todas las muestras se analizaron con un instrumento BD FACSCantoll (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania). Por cada muestra, se registraron al menos 10 000 eventos de medición relevantes. Las señales de fluorescencia FITC, PE, PerCP y APC se visualizaron como datos intensificados logarítmicamente. El análisis se realizó con el software BD FACSDiva v6.1 (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania).

Estrategia de separación (“gating strategy”) para la identificación de los macrófagos (Fig.1):

55 En el primer paso, para la identificación de los monocitos (indicados aquí con la leyenda “monos”), se grafican todos los leucocitos en términos de su granularidad (SSC-A) y su tamaño (FSC-H) (véase la Fig.1a).

Únicamente las células así caracterizadas se analizan a su vez para detectar la presencia del marcador de superficie CD14. Estas incluyen tanto las células más brillantes (es decir, altamente positivas), que corresponden a la nube superior ovalada de puntos, como las de brillo intermedio (normalmente positivas). Alrededor de estas células más brillantes y de brillo intermedio, se ubica una región (identificada como CD14) para su caracterización posterior (véase la Fig.1b).

Esta región se analiza a su vez para detectar la presencia del marcador de superficie CD16. Estas incluyen tanto las células más brillantes (es decir, altamente positivas), que corresponden a la nube superior ovalada de puntos, como las de brillo intermedio (normalmente positivas). Alrededor de estas células más brillantes y de brillo intermedio, análogamente, se ubica una región (identificada como CD16) para su caracterización posterior (véase la Fig.1c).

Todas las células identificadas como "monocitos" y también como "CD14-positivas" se analizan a su vez para detectar la presencia intracelular del anticuerpo Apo10 con el fin de optimizar la estimación del corte subjetivo.

Así, los macrófagos contenidos en las regiones "monocitos" y "CD14" llevan los marcadores de superficie CD14 y CD16. Luego, los macrófagos así identificados se dividen, por medio del corte (línea divisoria) horizontal, en dos poblaciones: células Apo10-negativas debajo del corte y células Apo10-positivas por encima del corte. Como resultado de la medición, el valor de EDIM se muestra como la cantidad relativa (en porcentaje) de macrófagos CD14-positivos/CD16-positivos (CD14+/CD16+) que contienen Apo10 (en relación con la cantidad total de macrófagos CD14+/CD16+).

El resultado de esta medición de "detección del epítipo en monocitos/macrófagos" (EDIM) consiste en la determinación o visualización de la cantidad relativa (en porcentaje) de macrófagos CD14-positivos/CD16-positivos (CD14+/CD16+) que también contienen Apo10 (es decir, que también son Apo10-positivos) en relación con la cantidad total de macrófagos CD14+/CD16+.

Los macrófagos en los que el anticuerpo introducido en el interior de la célula se une al epítipo tienen una señal más intensa que los demás macrófagos y cuentan como células Apo10-positivas.

Determinación del corte

(A) Enunciado del problema de la determinación correcta del corte con sangre de un paciente en el análisis "EDIM normal" como ejemplo.

En esta preparación, se utilizan simultáneamente dos anticuerpos de detección intracelulares (a saber, Apo10 y TKTL1) y se los analiza en términos de la tinción y la emisión de señal.

Los resultados de la medición se muestran en la Fig.2 (a) y la Fig.2 (b).

La Fig.2 (a) muestra el resultado de la tinción EDIM con el anticuerpo Apo10 (FITC), es decir, del método de detección EDIM con el anticuerpo Apo10 (FITC):

En la imagen de la derecha se representan los macrófagos y en la imagen de la izquierda se muestran los monocitos que no se interpretan aquí en mayor detalle. El contenido de macrófagos Apo10-positivos, es decir, de macrófagos en los que el canal de medición FITC emite una señal leve (puntos de señal rojos) se encuentra 16,7 % por encima del corte horizontal (frontera de separación).

La Fig.2 (b) muestra el resultado de la tinción EDIM con el anticuerpo TKTL1 (PE), es decir, del método de detección EDIM con el anticuerpo TKTL1 (PE):

En la imagen de la derecha se representan los macrófagos y en la imagen de la izquierda se muestran los monocitos que no se interpretan aquí en mayor detalle. El contenido de macrófagos prominentes, es decir, de macrófagos en los que el canal de medición PE emite una señal leve (puntos de señal rojos) se encuentra 17,2 % por encima del corte horizontal (frontera de separación).

Se concluye que asignar e interpretar los macrófagos (específicamente) positivos/prominentes, es decir, ubicar el umbral (la frontera de separación) resulta muy difícil debido a las múltiples señales no específicas, y únicamente una persona versada en la técnica y muy experimentada puede hacerlo exitosamente. En la práctica, únicamente tal persona versada en la técnica y experimentada reconoce dentro de la nube de macrófagos regiones muy estrechas en las que los macrófagos positivos se distinguen de los negativos y ubica el corte allí.

Para una mejor normalización, sería útil contar con una estimación confiable de la señal de fondo (no específica) para poder ubicar el corte (línea divisoria entre los macrófagos positivos y negativos) de manera más simple y precisa.

Así, en primer lugar, se realizó un control FMO convencional.

Control FMO

En/con este control FMO, se determina la fluorescencia intrínseca de las células y, además, la emisión de las tinturas de los anticuerpos extracelulares en el canal de medición de la tintura que se utiliza para la tinción intracelular, para lo cual se efectúa una medición sin el anticuerpo de tinción intracelular. Así, si había un control FMO, se realizaba una medición con los anticuerpos contra CD14 y CD16, pero no con anticuerpos Apo10.

La Fig.3 muestra la relación entre los resultados de las mediciones sobre las “preparaciones reales de análisis” y los resultados de las mediciones sobre este control FMO:

La Fig.3 (a) muestra el resultado de la tinción individual con Apo10 (FITC), es decir, del método de detección EDIM con el anticuerpo Apo10 (FITC) sin el anticuerpo secundario TKTL1:

En la imagen de la derecha se representan los macrófagos y en la imagen de la izquierda se muestran los monocitos que no se interpretan aquí en mayor detalle. La proporción de macrófagos Apo10-positivos, es decir, de macrófagos que emiten una señal leve en el canal de medición FITC (puntos de señal rojos) se encuentra 16,7 % por encima del corte horizontal (frontera de separación).

La Fig.3 (b) muestra el resultado del control FMO (sin anticuerpo FITC):

En la imagen de la derecha se representan los macrófagos y en la imagen de la izquierda se muestran los monocitos que no se interpretan aquí en mayor detalle. La proporción de macrófagos por encima del corte es apenas 0,8 % y estos se encuentran claramente separados de la nube de macrófagos no teñidos. Aquí, el corte se transfirió de la medición (a) a la medición del control FMO.

Conclusión:

El control FMO no es adecuado para que los resultados se usen para la medición con el anticuerpo. Además de las señales específicas debidas a la unión del anticuerpo a las estructuras específicas que se pretende detectar, todas las células muestran señales más intensas hacia el FMO. Esto puede deberse a los anticuerpos que se unen de manera no específica o que permanecen en las células luego del proceso de lavado.

Por consiguiente, el corte se debe ubicar de manera óptima para que las células de la nube permanezcan por debajo del corte y el corte separe las células realmente positivas.

Sin embargo, es precisamente esta división óptima (ubicación del corte) que requiere experiencia en el campo de la citometría de flujo y, especialmente, experiencia con cada problema individual, tal como, por ejemplo, la detección de los anticuerpos Apo10 o TKTL1 en macrófagos. Hasta el momento, esta característica no ha permitido la adopción del enfoque en análisis de laboratorio de rutina y/o involucra el riesgo de determinar resultados falsos positivos y, por ende, generar hallazgos falsos.

(C) Medición paralela con anticuerpo Apo10 y anticuerpo Apo10 bloqueado por el péptido específico.

Para reducir la porción no específica de estas señales, se realizó una segunda medición con una preparación de control de acuerdo con la invención hecha análogamente a la de la preparación real de análisis, con los mismos componentes en las mismas cantidades que en esta preparación real de análisis, pero que difería de ella únicamente en que el sitio de unión específico del anticuerpo se había bloqueado antes de la incubación con el péptido específico (epítipo peptídico de la estructura blanco). Este anticuerpo bloqueado ya no puede unirse específicamente, de manera que las señales medidas en esta preparación de control resultan de la unión no específica o bien de la presencia residual del anticuerpo en las células (tras el procedimiento de lavado).

La medición real (es decir, el/los valor(es) medido(s) en la preparación real de análisis) se puede reducir en este valor y así corregirse, dado que el valor medido representa el valor de (todas) las señales no específicas.

Antes de realizar la medición real, se debe determinar la concentración (molar) adecuada del péptido bloqueador. Para ello, en este ejemplo, se añadió un exceso molar creciente (entre 1 vez (1X) y 1000 veces (1000X)) de este péptido bloqueador respecto del anticuerpo Apo10 (es decir, entre 1 y 1000 moles del péptido por cada mol del anticuerpo) y se observó su efecto sobre la unión no específica, manifestándose dicho efecto como una disminución de las señales de la nube de macrófagos.

La curva de titulación obtenida se muestra gráficamente en la Fig.4. En el eje X se muestra el exceso de péptido y en el eje Y se muestra el valor relativo de macrófagos prominentes por encima del corte (en %). Aquí, el operador determinó el corte usado como base en la tinción individual EDIM con el anticuerpo Apo10 no inhibido sobre la base de la distribución óptica de las células.

Para la medición real, se usaron dos preparaciones de control, una con un exceso de 10 veces del péptido bloqueador y otra con un exceso de 500 veces del péptido bloqueador. Los resultados de estas mediciones se muestran en la Fig.5: aunque con un exceso de 10 veces del péptido las señales específicas se pueden discernir sobre el corte (Fig.5, a), estas desaparecen con una concentración de 500 veces (Fig.5, b). Este exceso molar del péptido bloqueador de 500 veces en relación con el anticuerpo Apo10 es necesaria para eliminar las señales Apo10 específicas. Así, la tinción con Apo10 con 500 veces de exceso de péptido (anticuerpo Apo10 bloqueado) representa un control cuyas señales consisten en la fluorescencia intrínseca de las células, los anticuerpos unidos de manera no específica y los anticuerpos que permanecen en las células luego del procedimiento de lavado, es decir, las señales no específicas. Restar el resultado de esta medición no específica del resultado de la medición generada con el anticuerpo Apo10 no bloqueado permite determinar la señal específica.

Conclusión:

Con el método de la invención, se dispone de un método de evaluación, particularmente un método de evaluación automatizable, en el que, en cada caso, una medición con un anticuerpo bloqueado se resta de la correspondiente medición con el anticuerpo no bloqueado con el fin de determinar las señales de medición específicas.

5 Para ello, se debe seleccionar una concentración de péptido para suprimir completamente las señales específicas. Todas las señales todavía se pueden medir luego de dicha supresión se deben a la fluorescencia intrínseca de las células, a la unión no específica del anticuerpo (la región constante del anticuerpo) o a los anticuerpos que han permanecido dentro de la célula sin unirse a ningún epítipo. Todas estas señales no específicas se pueden determinar con el anticuerpo cuyos sitios de unión están bloqueados con el péptido, lo que inhibe la unión específica. Así, el anticuerpo bloqueado con el péptido representa la magnitud de la unión no específica. Las señales de medición con el anticuerpo no bloqueado están compuestas por señales específicas y no específicas y, por ende, son mayores, en general, que las señales de medición determinadas en un control FMO. Entonces, se pueden restar las señales no específicas (medición con el anticuerpo bloqueado) de los resultados de la medición generados con el anticuerpo no bloqueado para determinar las señales específicas. Así, la evaluación se puede realizar de manera totalmente automática y ya no es necesario que un evaluador realice la evaluación sobre la base de información óptica. Para ello, se utilizan los datos crudos depositados en el software de un citómetro de flujo. Luego, estos se pueden transferir para el cálculo, por ejemplo, a tablas de Excel, lo que facilita su procesamiento posterior. En consecuencia, los datos crudos generados con el anticuerpo bloqueado se comparan y restan de los datos crudos generados con el anticuerpo no bloqueado, lo que permite restar las señales no específicas de las señales totales y, así, determinar las señales específicas.

Antes de realizar la medición, se debe determinar, mediante pruebas, una concentración adecuada de bloqueadores del sitio de unión de cada anticuerpo. La concentración es específica de la combinación de anticuerpo con sitio de unión y reactivo bloqueador. Esto significa que, posiblemente, se deba usar otra proporción de péptido y anticuerpo con otros anticuerpos u otros tipos de células. Por lo tanto, esta proporción se debe determinar de nuevo para cada método de análisis.

Ejemplo 6: Principio de detección con el método de la invención en citometría de flujo con el anticuerpo "Apo10" sobre muestras de sangre

30 Las preparaciones de análisis se preparan como se describió en el ejemplo 5. La/cada preparación "real" de análisis se incuba con el anticuerpo Apo10 con tinción fluorescente apto para detección específica (no bloqueado), y la/cada preparación de control se incuba con el anticuerpo Apo10 con tinción fluorescente que tiene su dominio de unión bloqueado con el péptido del epítipo (y, por ende, ya no es apto para detección específica). También se preparó un control FMO (es decir, una preparación paralela a la preparación "real" de análisis pero, a diferencia de ella, sin nada de anticuerpo Apo10).

La Fig.6 A representa esquemáticamente dos células que muestran una señal Apo10 de diferente intensidad cuando (si, tan pronto como) el anticuerpo Apo10 no bloqueado que tiene una tintura fluorescente unida se usa para la detección en el citómetro de flujo. La señal CD16 se muestra en el eje X y la señal Apo10 se muestra en el eje Y.

40 En la Fig.6 B se muestra que, luego del bloqueo del dominio de unión del anticuerpo Apo10 con el péptido blanco en ambas células, la señal Apo10 se reduce y, consecuentemente, ambas células migran hacia abajo en el diagrama (de valores medidos en la citometría de flujo). Sin embargo, la magnitud de la reducción de la señal Apo10 es diferente en ambas células. En la célula de la derecha, la reducción de la señal Apo10 es mayor: ahora, se observa considerablemente más abajo en el diagrama que la célula de la izquierda. La diferencia en la intensidad de la señal Apo10 con el anticuerpo no bloqueado y con el anticuerpo bloqueado da la magnitud de las señales específicas que se generan por la unión específica del anticuerpo Apo10. Cuanto más disminuye la señal Apo10 luego de bloquear el anticuerpo con el péptido, mayor es la proporción de señal específica. Así, la longitud de la flecha da la magnitud de la disminución de la señal Apo10 luego del bloqueo del anticuerpo (véase la Figura 7). Esta es la magnitud de las señales Apo10 específicas.

La Figura 7 A es idéntica a la Figura 6 A. La Figura 7 B corresponde a la Figura 6 B con la adición de la representación gráfica de la magnitud de la reducción en la señal Apo10 en ambas células. La magnitud de la disminución en las células Apo10-positivas representa la magnitud de la reducción en la señal que se crea al bloquear el dominio de unión del anticuerpo Apo10 con péptido. La reducción en la señal Apo10 es mayor en la célula ubicada a la derecha. La diferencia entre la intensidad de la señal Apo10 con el anticuerpo no bloqueado y con el anticuerpo bloqueado es mayor en la célula de la derecha, de manera que la magnitud de la señal específica es mayor. Aunque la intensidad de la señal Apo10 en la célula de la izquierda es mayor que en la célula de la derecha, la de la derecha tiene, al mismo tiempo, una proporción mayor de señal Apo10 específica. La diferencia (delta) entre la medición con el anticuerpo Apo10 no bloqueado y con el anticuerpo Apo10 bloqueado está dada por la longitud de la flecha en el diagrama y muestra la magnitud de la tinción Apo10 específica. Así, las flechas indican la magnitud de la disminución de la señal debido al bloqueo del anticuerpo con el péptido. El bloqueo del anticuerpo Apo10 con el péptido permite determinar la magnitud de la unión específica. Al mismo tiempo, esto permite identificar las células que tienen mayor proporción de señal Apo10 específica, independientemente de la intensidad de la señal total. Gracias a ello, se pueden identificar las células en las que la señal Apo10 es baja pero más específica que en otras células con una señal Apo10 más intensa.

La Figura 8 es una representación esquemática de células que se tiñeron con CD14 y CD16 y se graficaron en el eje X vs. el CD16. Se analizaron las preparaciones (“reales”) de análisis y los controles FMO.

5 En la Figura 8 A, se muestran las células del control FMO (sin adición del anticuerpo Apo10).
En la Figura 8 B, se muestra que, al añadir el anticuerpo Apo10 marcado fluorescentemente, se detectan las señales Apo10. La señal Apo10 aumenta debido a las señales específicas y no específicas en todas o casi todas las células, con lo cual estas células migran hacia arriba en el diagrama (la nube de células migra hacia arriba). En este caso, las células con señal Apo10 muy intensa se separan un poco por encima de la nube. Sin embargo, no surge una nube independiente de células Apo10-positivas sobre la nube original de células FMO.

La Figura 9 muestra cómo se ubica el corte en un diagrama de acuerdo con la Figura 8 (diagrama de las células teñidas con CD14 y CD16 y graficadas en el eje X vs. el CD16).

15 En la Figura 9 A, se muestran las células del control FMO (sin adición del anticuerpo Apo10).
La línea de trazos marca el corte sobre la nube de células del control FMO.
En la Figura 9 B, la línea de trazos marca la línea divisoria (corte) sobre la nube de células FMO, que se transfirió a la nube de células con (o luego de o en el caso de) la tinción Apo10. Sin embargo, esta línea divisoria transferida desde el control FMO ya no es adecuada, dado que la nube de células ha migrado hacia arriba a causa de las señales específicas y no específicas debidas a la adición del anticuerpo Apo10 marcado fluorescentemente. La señal Apo10 surge debido a las señales específicas y no específicas en todas o casi todas las células, con lo cual las células del diagrama migran hacia arriba en el diagrama (la nube de células migra hacia arriba). Las células con señal Apo10 muy intensa se separan un poco por encima de la nube. Sin embargo, no surge una nube independiente de células Apo10-positivas sobre la nube original de células. De todos modos, sobre la base del estrechamiento o la menor densidad de las células en una región, se introduce una línea divisoria (línea sólida) basada en esta diferencia óptica, que debería dividir las células Apo10-positivas de las Apo10-negativas. Sin embargo, esta línea divisoria se encuentra en un nivel considerablemente más alto que el que se puede deducir sobre la base del control FMO. Aquí, una célula que se encuentra sobre la línea divisoria se considera Apo10-positiva. Sin embargo, las células cuya intensidad aumenta debido a la adición del anticuerpo Apo10 no siempre cruzan la línea divisoria sólida. Si esto ocurre, las células en cuestión se clasifican como negativas, a pesar de que podría tratarse de células Apo10-positivas con señal Apo10 específica.

La Figura 10 es, una vez más, una representación esquemática de células que se tiñeron con CD14 y CD16 y se graficaron en el eje X vs. el CD16. Las células que llevan el antígeno Apo10 se indican con un círculo con un triángulo

35 en su interior (). Las células que llevan el antígeno Apo10 y están marcadas por unión del anticuerpo Apo10 marcado fluorescentemente a este antígeno, y que emiten las señales de fluorescencia correspondientes (a esta unión) se muestran aquí, cada una, con un círculo con un cuadrado en su interior (.

40 En la Figura 10 A, se muestran los valores medidos del control FMO (sin adición del anticuerpo Apo10). Hay presencia de células positivas para el antígeno Apo10 (indicadas con un círculo con un triángulo en su interior), pero estas no se detectan aquí (dado que no hay presencia de anticuerpo Apo10 ligado).

En la Figura 10 B, se muestra que, al añadir el anticuerpo Apo10 marcado fluorescentemente, se tiñen ambas células que llevan el antígeno Apo10 (círculos con cuadrado). Los dos círculos con triángulos () que se muestran indican la posición anterior de estas dos células que llevan el antígeno Apo10 de acuerdo con la Figura 10 A. Tras la adición del anticuerpo Apo10, la proporción de señales no específicas también aumenta. De hecho, esto ocurre en todas o casi todas las células. Esto puede deberse específicamente, por ejemplo, a la adhesividad del anticuerpo. La señal Apo10 de la célula de la izquierda marcada con el cuadrado () aumenta debido a la adición del anticuerpo Apo10, pero menos intensamente que la señal Apo10 de la célula de la derecha marcada con un cuadrado. Aunque, así, la intensidad total de la señal Apo10 es menor en la célula de la derecha que en la de la izquierda, la magnitud de la señal Apo10 específica en la célula de la derecha es mayor que en la célula de la izquierda.

La Figura 11 muestra cómo se ubica un corte en un diagrama como el de la Figura 10.

55 Al añadir el anticuerpo Apo10 marcado fluorescentemente, una porción diferente de la cantidad total de células sube en distinta medida (la nube migra hacia arriba). Una persona versada en el campo de la citometría de flujo puede, sobre la base del estrechamiento o la menor densidad de células en una región, reconocer una población de células en la región superior de la nube general de células que, así, tienen una señal Apo10 intensa y se separan un poco del resto de la nube pero, como regla general, no forman una nube independiente de la nube principal. En base a ello, reconocer estas diferencias ópticas (estrechamiento de la nube, menor densidad en la transición desde las células Apo10-negativas hacia las Apo10-positivas) e introducir una línea divisoria solo resulta posible con ayuda de un experto. Esta línea divisoria se encuentra en un nivel considerablemente más alto que el que se puede deducir sobre la base del control FMO. Esto se debe a que la nube en su conjunto sube debido a una combinación de señales Apo10 específicas y no específicas. Aquí, una célula que se encuentra sobre la línea divisoria se considera Apo10-positiva. Las células cuya señal aumenta marcadamente por la adición del anticuerpo Apo10 pero aún así no cruzan la línea

divisoria se evalúan como negativas. Esto significa que una célula no se clasifica como Apo10-positiva únicamente sobre la base del aumento en la señal Apo10, sino sobre la base del aumento pero también, principalmente, sobre la base de la intensidad de la señal. Así, únicamente las células con señal más intensa, y, por ende, las células por encima de la línea divisoria (corte) se clasifican como positivas. Por consiguiente, la evaluación solo puede realizarla una persona versada en la técnica. Las células positivas que no migran por encima del corte se clasifican como negativas a pesar de que podrían ser células positivas, lo que puede falsificar el resultado.

Ejemplo comparativo 7: Uso del método de la invención en un método de detección inmunohistoquímico con el anticuerpo "Apo10" sobre secciones de tejido de carcinoma de la cavidad bucal

El anticuerpo "Apo10" es un anticuerpo monoclonal IgG2a dirigido contra el epítipo Apo10 de la proteína DNasaX, que está presente en mayor cantidad en ciertas células tumorales y que, en virtud de ello, puede servir como indicador para la identificación de estas células tumorales.

El anticuerpo "Apo10" se generó mediante una inmunización de ratas con un péptido de la DNasaX con la secuencia CASLTKKRLDKLELRTEPGF. Esta secuencia de aminoácidos representa los aminoácidos 187 a 206 de la proteína DNasaX (símil desoxirribonucleasa I n.º 1), que consiste en un total de 302 aminoácidos. La secuencia completa de la proteína DNasaX está disponible con el código de acceso gbAAV38793.1.

El epítipo blanco del anticuerpo Apo10 es este (aquel) péptido que, en su generación, se utilizó para la inmunización usada para las células productoras de anticuerpos (en la rata), a saber, un péptido con la secuencia de aminoácidos CASLTKKRLDKLELRTEPGF.

La "tinción de análisis con anticuerpo Apo10" se realiza sobre muestras de tejido humano embebidas en parafina y fijadas en formalina (FFPE) como la llamada "tinción individual con Apo10" inmunohistoquímica (IHC) en combinación con el método de la biotina-estreptavidina marcada (sistema LSAB).

Para ello, las secciones de tejido FFPE primero se desparafinan y rehidratan, se induce térmicamente su desenmascaramiento, se lavan y, opcionalmente, se bloquean con peroxidasa y/o biotina y/o suero. A continuación, se incuban con el anticuerpo de detección Apo10 como medio de dilución primario del anticuerpo (p. ej., aplicación de 100 µl de solución primaria de anticuerpo por sección de tejido), preferentemente de un día para otro a 4 °C en una cámara de humedad. El bloqueo del dominio de unión se realiza por incubación a 4 °C de un día para otro con un exceso molar de 10 veces del péptido en relación con el anticuerpo usado para obtener la solución primaria del anticuerpo bloqueado.

A continuación, las secciones de tejido se lavan (p. ej., durante 2x2 minutos con *buffer* de lavado) y se incuban con un anticuerpo secundario biotilado (p. ej., fragmentos F(ab')₂ de asno conjugados con biotina contra IgG (H+L) de rata, dilución 1:100) durante 45 minutos a temperatura ambiente en una cámara de humedad. A continuación, las secciones de tejido se lavan nuevamente (p. ej., durante 2x2 minutos con *buffer* de lavado) y se incuban con estreptavidina (p. ej., kit LSABTM2 "LABEL") durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara de humedad.

A continuación, se realiza otro lavado (p. ej., durante 2x2 minutos con *buffer* de lavado) y, luego, una incubación con cromógeno para HRP (p. ej., Biogenex, DAB) durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente en una cámara de humedad (el tiempo de incubación se determina de acuerdo con las instrucciones del fabricante). A continuación, se tiñen en primer lugar con DAB y, luego, se realiza una tinción nuclear con hematoxilina (p. ej., 3 minutos a temperatura ambiente, en función de la intensidad deseada).

La tinción se completa con un lavado o enjuague (p. ej., con agua de grifo) y, finalmente, las secciones de tejido se montan (p. ej., en un medio acuoso o tras la deshidratación con una serie creciente de alcoholes/xileno en un medio de polímero durable).

Las secciones de tejido montadas se analizan y evalúan mediante microscopía de fluorescencia.

Los resultados de este análisis se muestran en la Fig.12. Estos resultados muestran que el anticuerpo Apo10 detecta el epítipo Apo10 de la proteína DNasaX en el núcleo celular de las células tumorales (véase la Fig.12 a). Por otro lado, en las células del estroma y las células epiteliales saludables, no se distingue tinción con Apo10 y, por ende, no se detecta el epítipo proteico Apo10 (no se muestra). La tinción con Apo10 del núcleo celular de las células tumorales ya no es visible cuando el péptido epítipo/péptido blanco (con la secuencia de aminoácidos CASLTKKRLDKLELRTEPGF) se añade en un exceso molar de 10 veces en relación con el anticuerpo Apo10 antes de la tinción (véase la Fig.12 b).

Medición inmunohistoquímica comparativa

Para la comparación de dos mediciones inmunohistoquímicas, en las que la tinción inmunohistoquímica con anticuerpo no bloqueado se compara con la tinción con anticuerpo bloqueado, se pueden usar secciones consecutivas, es decir, dos secciones sucesivas del tejido (tumoral). Así, la resta de dos señales generadas en dos secciones de tejido

sucesivas permite calcular las señales específicas. Este método de secciones consecutivas se usó en el caso de la Fig.12.

5 Otra posibilidad para la medición comparativa de tinciones inmunohistoquímicas consiste en primero añadir el anticuerpo bloqueado a la sección de tejido para detectar las señales no específicas. A continuación, la misma sección de tejido se puede teñir con el anticuerpo no bloqueado para detectar la señal que genera la unión específica entre el anticuerpo no bloqueado y el epítipo blanco. En consecuencia, las señales específicas se pueden calcular como la resta de las señales generadas en la misma sección de tejido. En este procedimiento, las señales nuevas que surgen (señales de la segunda tinción) representan las señales específicas generadas por el anticuerpo no bloqueado. Una
10 modificación de esta forma de tinción consecutiva consiste en añadir el anticuerpo bloqueado en una proporción distinta que en la medición posterior con el anticuerpo no bloqueado, de manera que el anticuerpo bloqueado se use, por ejemplo, en una concentración molar 2 veces mayor que el anticuerpo no bloqueado. El exceso de anticuerpo bloqueado se puede incrementar todavía más (p. ej. razón 3:1 entre anticuerpo bloqueado en la primera tinción y anticuerpo no bloqueado en la segunda tinción. Esta proporción se puede incrementar aún más a razones de 200:1,
15 500:1 o incluso más. Con esta serie de titulación, se puede encontrar una razón óptima entre anticuerpo bloqueado en una medición y anticuerpo no bloqueado en la otra, de manera que la intensidad de las señales específicas se puede seleccionar para que estas sean suficientemente altas. Así, se puede aumentar aún más la especificidad, dado que la unión no específica se satura cada vez más y, mediante una comparación con el anticuerpo no bloqueado, la unión específica se puede determinar de manera aún más selectiva.

20 Otra posibilidad para la medición comparativa de tinciones inmunohistoquímicas consiste en primero añadir el anticuerpo bloqueado a la sección de tejido para detectar las señales no específicas. A continuación, el anticuerpo se puede quitar de la sección de tejido mediante un lavado delicado. Luego, la misma sección de tejido se tiñe nuevamente con el anticuerpo no bloqueado. Como resultado, se detectan tanto las señales específicas como las no específicas. La resta de las señales de las dos mediciones generadas en la misma sección de tejido (es decir, la
25 diferencia entre ellas) permite calcular las señales específicas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la identificación, cuantificación y discriminación de señales específicas frente a señales no específicas en un método de detección que se realiza con al menos un detector para ubicar e identificar estructuras blanco específicas en material de muestra, en donde el detector envía o genera señales para su determinación y estas señales permiten una cuantificación del detector, y en donde las señales específicas son las señales enviadas o generadas por el detector debido al hallazgo y la identificación de la estructura blanco, caracterizado dicho método por:
 - 5 - que el análisis comprende al menos una preparación de análisis y al menos una preparación de control, que se procesan en paralelo;
 - 10 - que la preparación de control contiene los mismos componentes en las mismas cantidades que la preparación de análisis que se procesa en paralelo, pero difiere de la preparación real de análisis en que el/los dominio(s) de unión de el/los detector(es) está(n) bloqueado(s); y
 - 15 - que la totalidad de las señales medidas en la preparación de control se resta de la totalidad de las señales medidas en la preparación de análisis, en donde la diferencia constituye la señal específica del/de los detector(es) de la(s) estructura(s) celular(es) que se pretende determinar,
 - 20 en donde el método de detección es un método de análisis citométrico de flujo y se realiza mediante citometría de flujo.
2. El método de la reivindicación 1, caracterizado por que, en la preparación de control, el/los dominio(s) de unión del/de cada detector está(n) bloqueado(s) con una estructura que es similar a la estructura blanco.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, caracterizado por que el/los detector(es) es/son (un) anticuerpo(s) (anticuerpo(s) de detección), preferentemente (un) anticuerpo(s) monoclonal(es).
- 30 4. El método de la reivindicación 3, caracterizado por que, en la preparación de control, el/los dominio(s) de unión del/de los anticuerpo(s) (anticuerpo(s) de detección) está(n) bloqueado(s) con un péptido que exhibe la secuencia de aminoácidos de la estructura blanco.
- 35 5. El método de la reivindicación 3, caracterizado por que, en la preparación de control, el/los dominio(s) de unión del/de los anticuerpo(s) (anticuerpo(s) de detección) está(n) bloqueado(s) con un fragmento de proteína o con una proteína que comprende la estructura blanco.
- 40 6. El método de la reivindicación 3, caracterizado por que, en la preparación de control, el/los dominio(s) de unión del/de los anticuerpo(s) (anticuerpo(s) de detección) está(n) bloqueado(s) por la unión de uno o más competidores peptídicos, en donde cada competidor peptídico es funcional o efectivamente igual al péptido que exhibe la secuencia de aminoácidos de la estructura blanco.
- 45 7. El método de la reivindicación 3, caracterizado por que, en la preparación de control, el/los dominio(s) de unión del/de los anticuerpo(s) (anticuerpo(s) de detección) está(n) bloqueado(s) por la unión de uno o más competidores peptídicos y/o fragmentos de proteína y/o proteínas, en donde cada competidor peptídico es funcional o efectivamente igual al péptido que exhibe la secuencia de aminoácidos de la estructura blanco y cada fragmento de proteína o competidor peptídico comprende la estructura blanco.
- 50 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la detección de las señales de reacción en la preparación de control (RS-K) y en la preparación real de análisis (RS-T) y/o la resta (RS-T menos RS-K) y la visualización de la diferencia ocurren de manera parcial o completamente automática.
- 55 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que el análisis de detección es un análisis inmunohistoquímico y que los resultados del análisis se registran y evalúan digitalmente, a saber, que la detección de las señales de reacción en la preparación de control (RS-K) y en la preparación real de análisis (RS-T) ocurre digitalmente, la resta (RS-T menos RS-K) ocurre de manera parcial o totalmente automática y la visualización de la diferencia ocurre digitalmente.
- 60 10. El método de la reivindicación 9, caracterizado por que el análisis de detección es un análisis de inmunofluorescencia y que los resultados del análisis de inmunofluorescencia se registran y evalúan digitalmente, a saber, que la detección de las señales de emisión en la preparación de control (RS-K) y en la preparación real de análisis (RS-T) ocurre digitalmente, la resta (RS-T menos RS-K) ocurre de manera parcial o totalmente automática y la visualización de la diferencia ocurre digitalmente.

Fig. 1

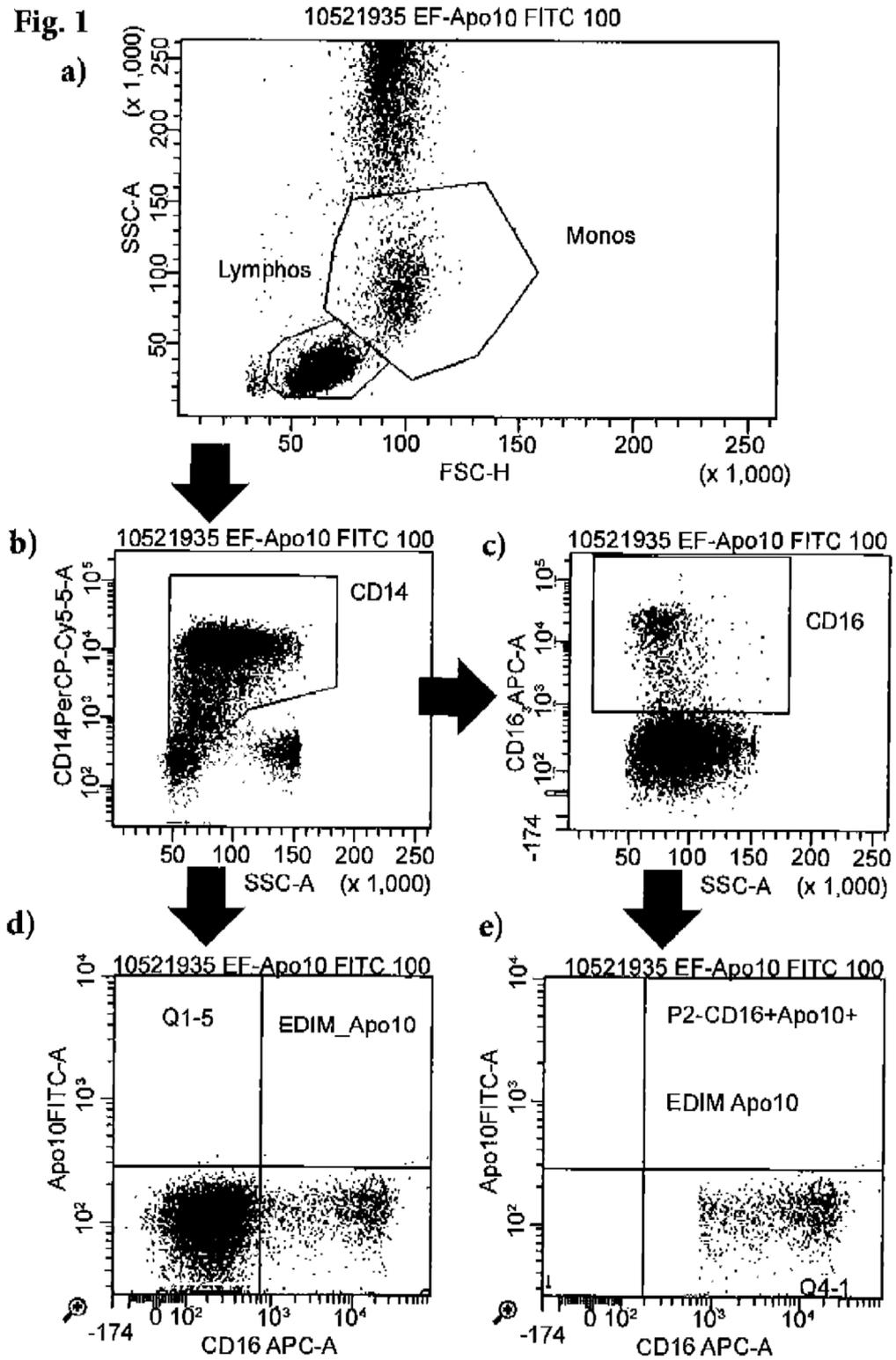
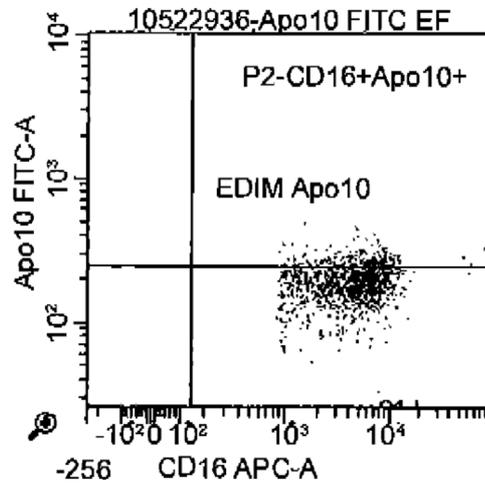
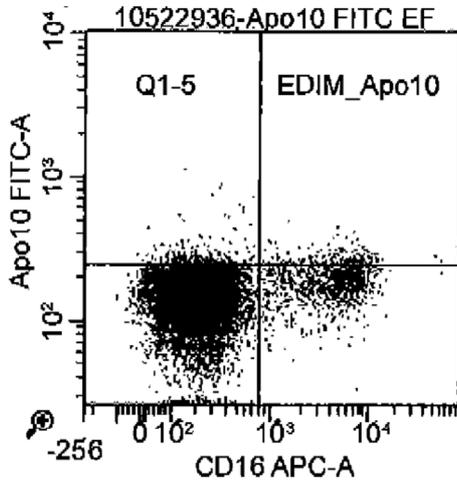


Fig. 2

a)



b)

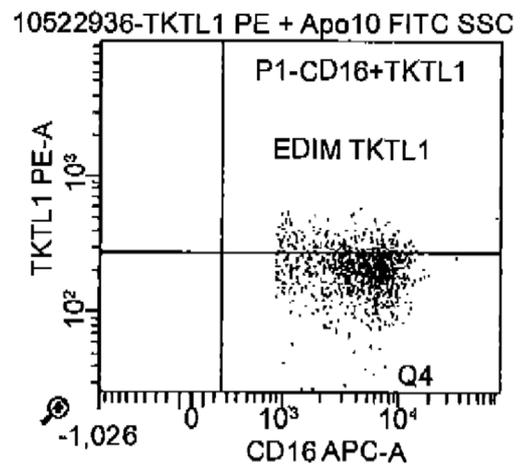
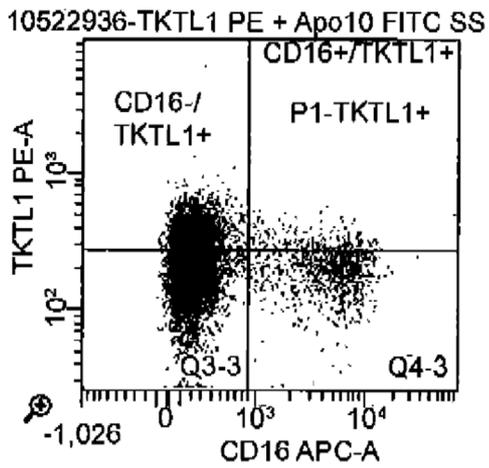
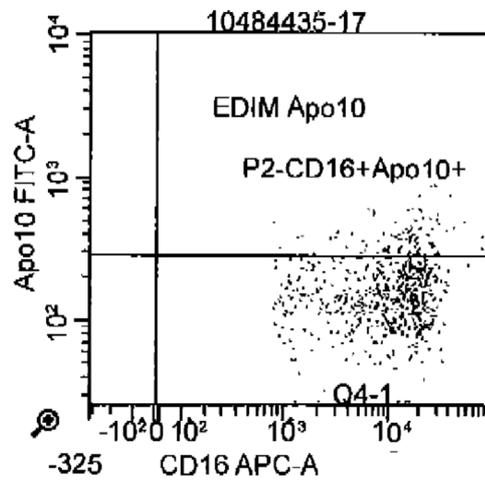
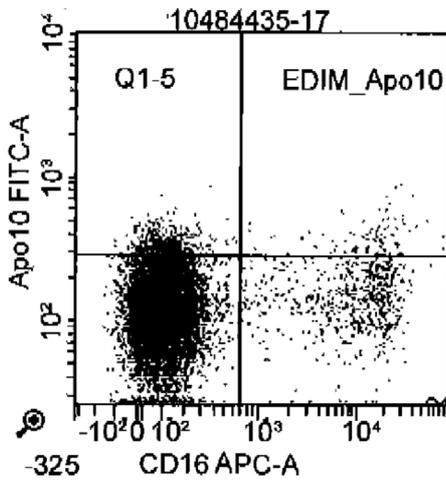


Fig. 3

a)



b)

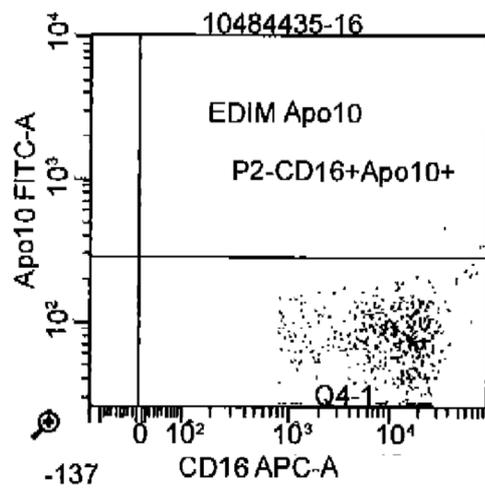
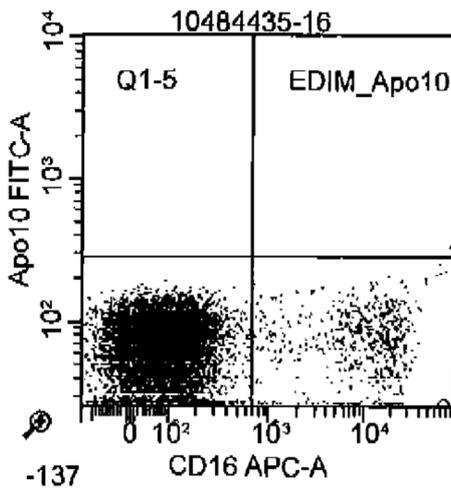


Fig. 4

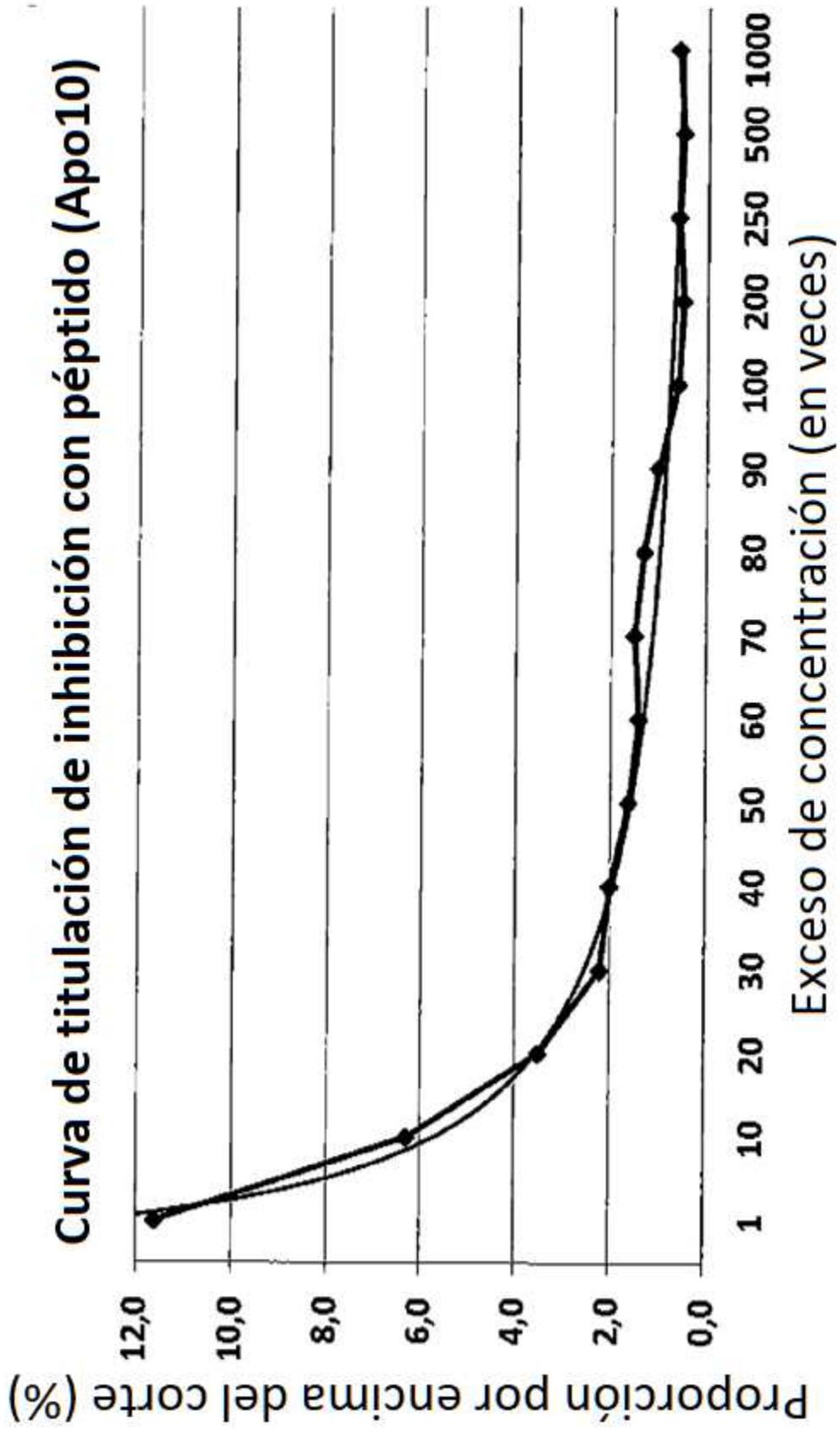
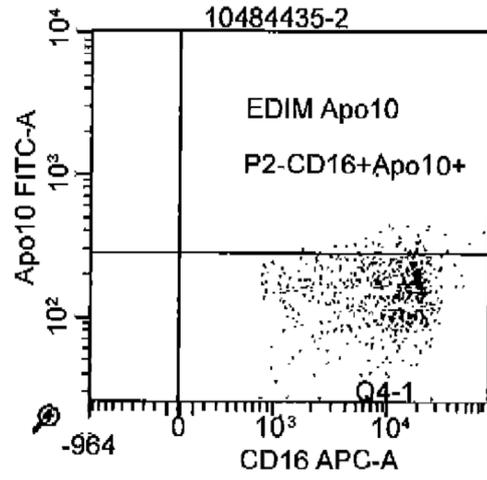
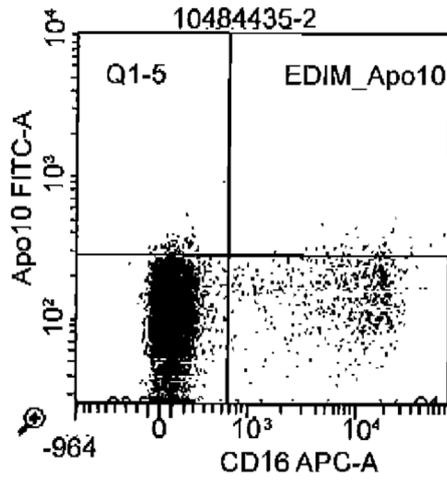
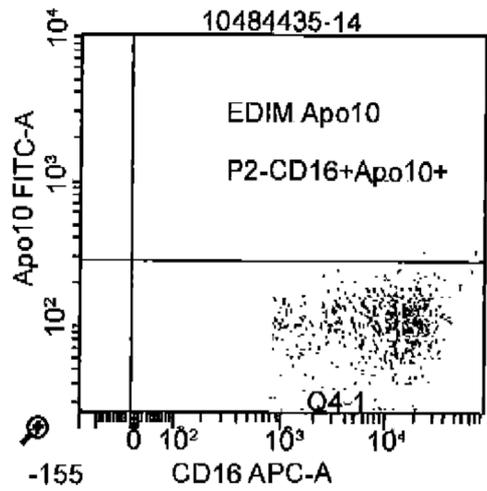
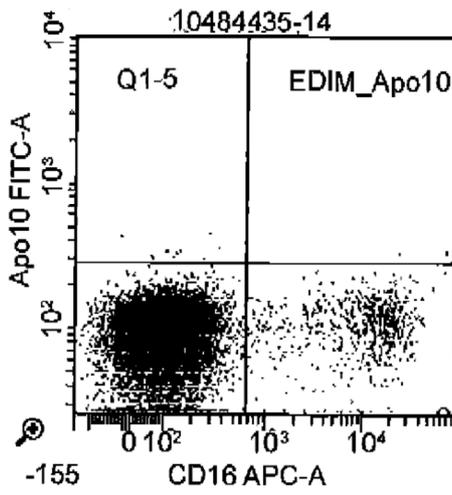


Fig. 5

a)



b)



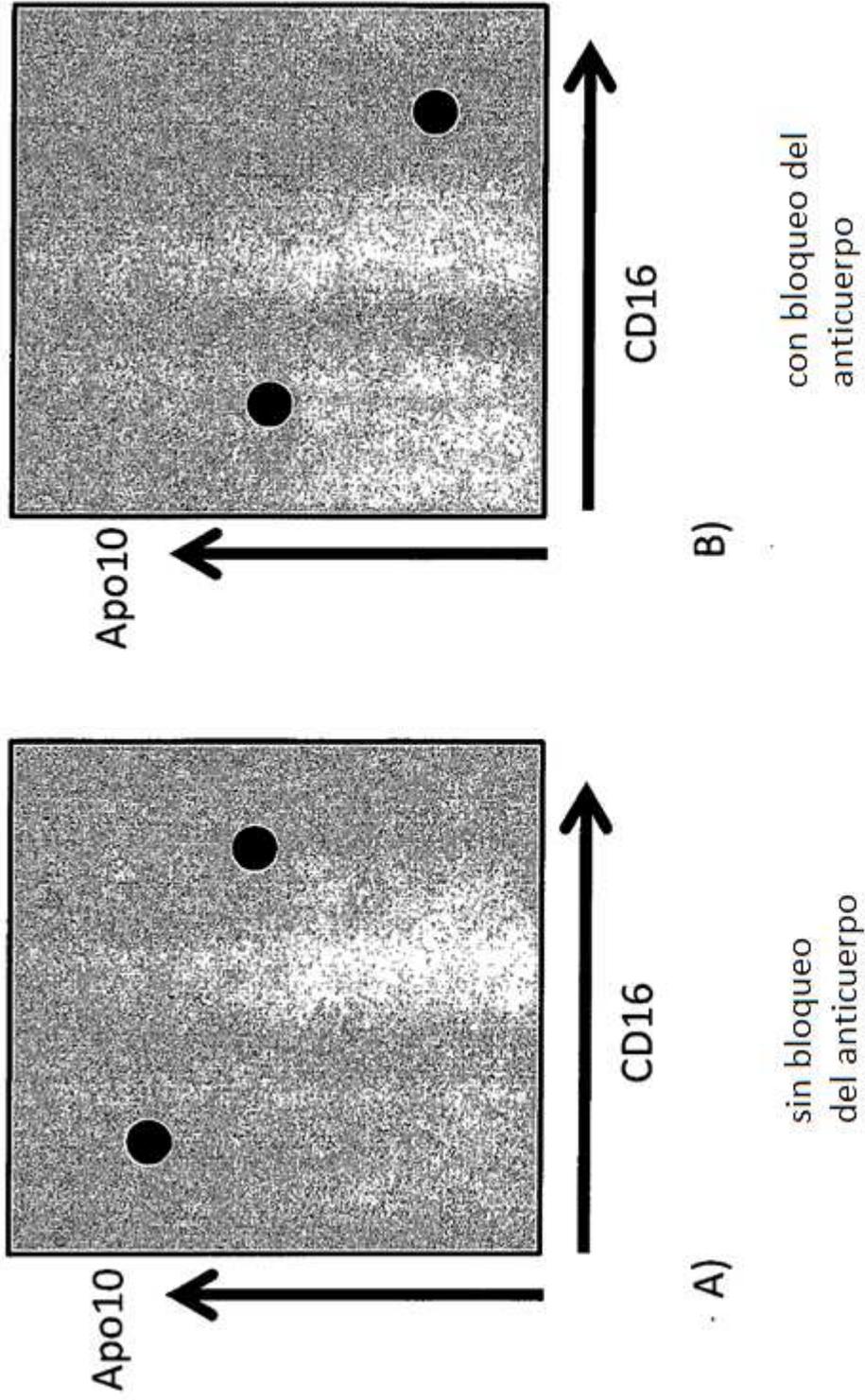


Fig. 6

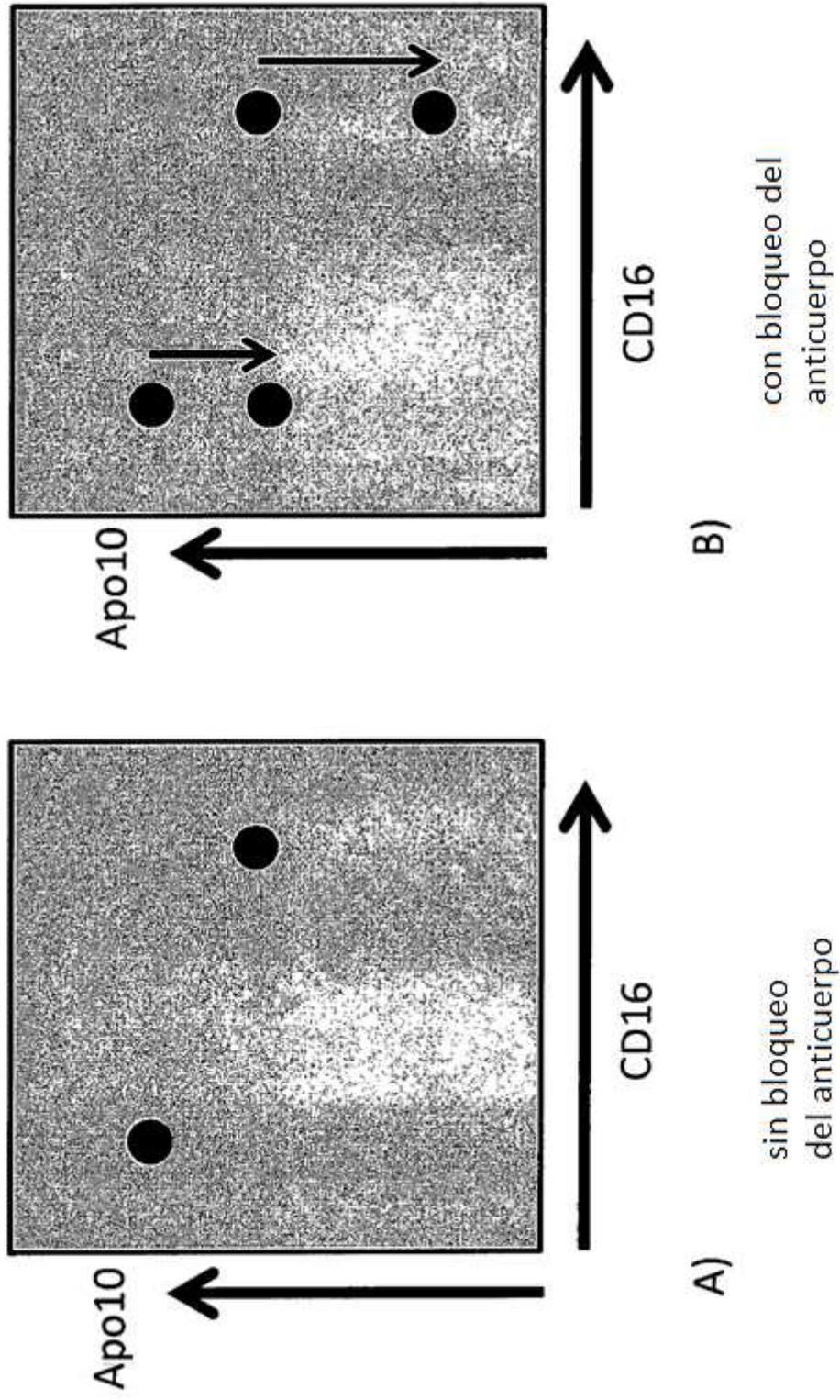


Fig. 7

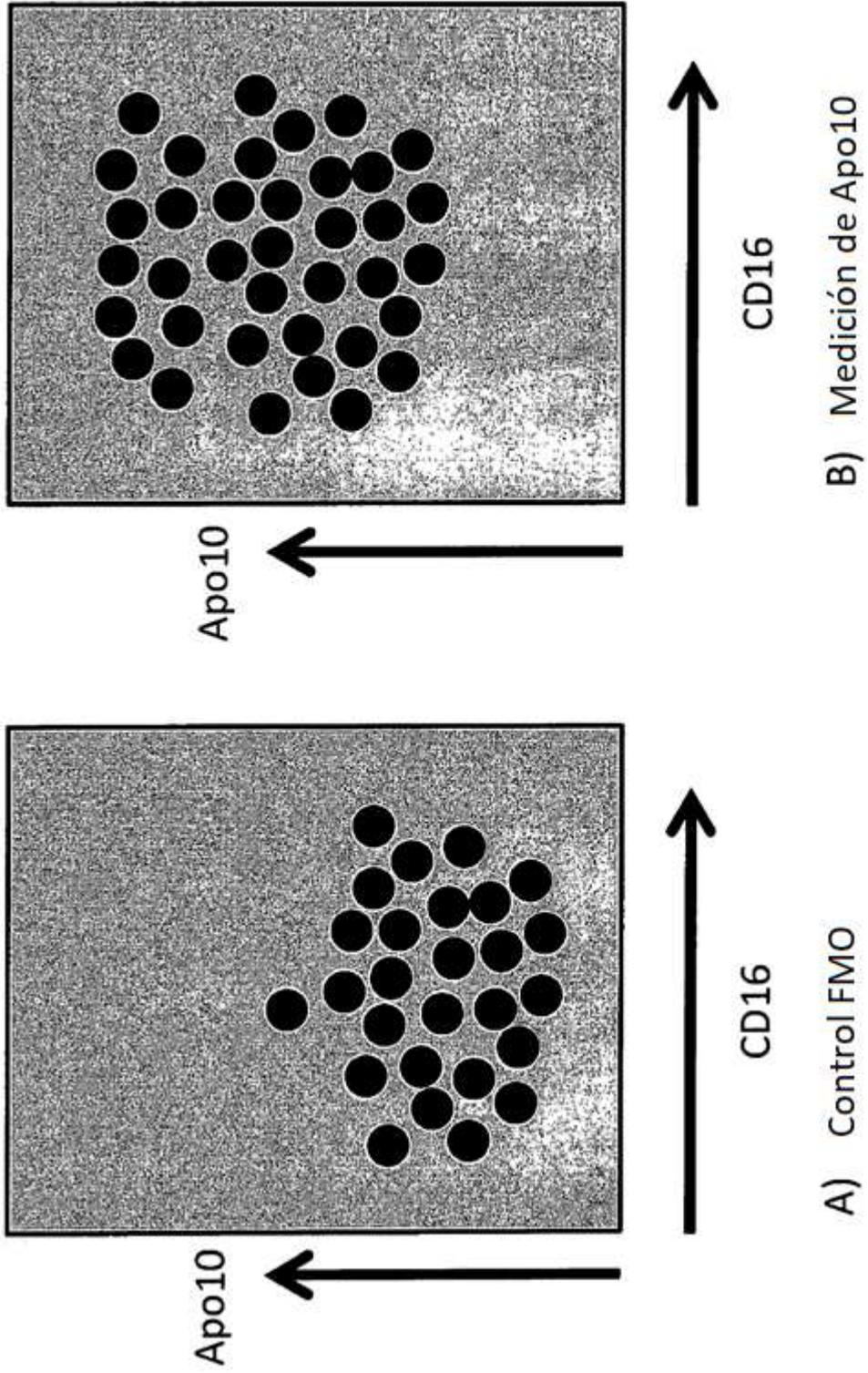


Fig. 8

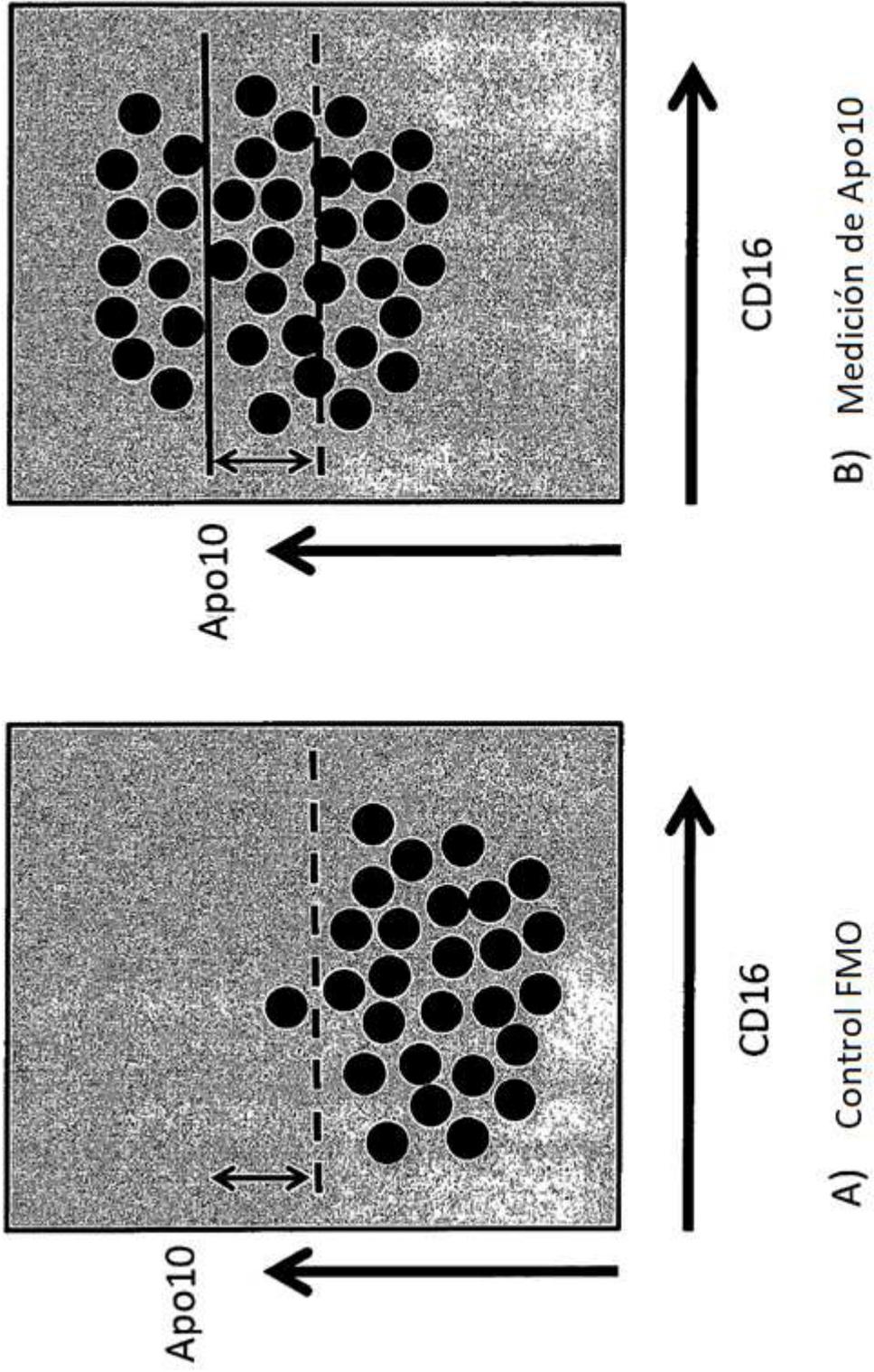


Fig. 9

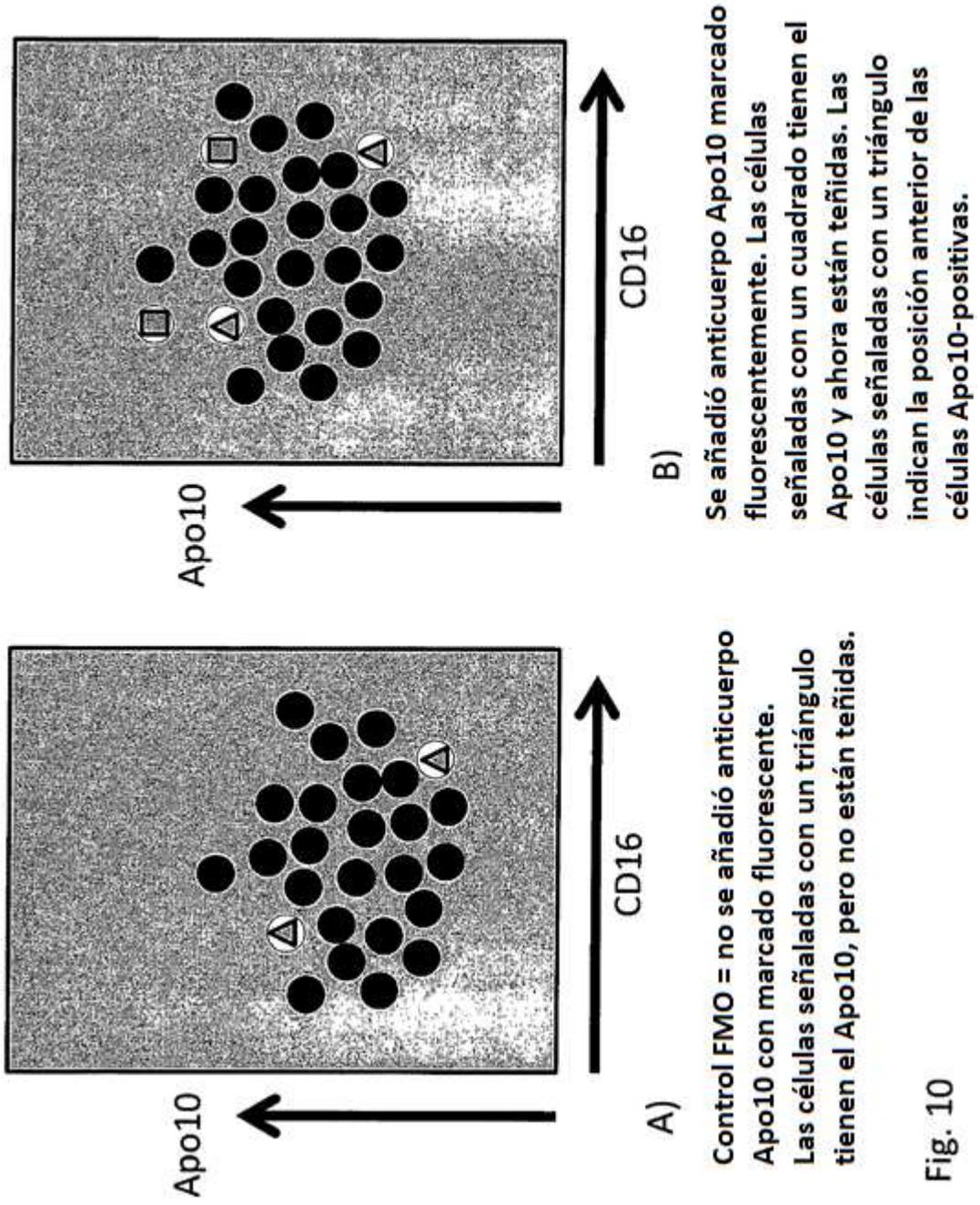


Fig. 10

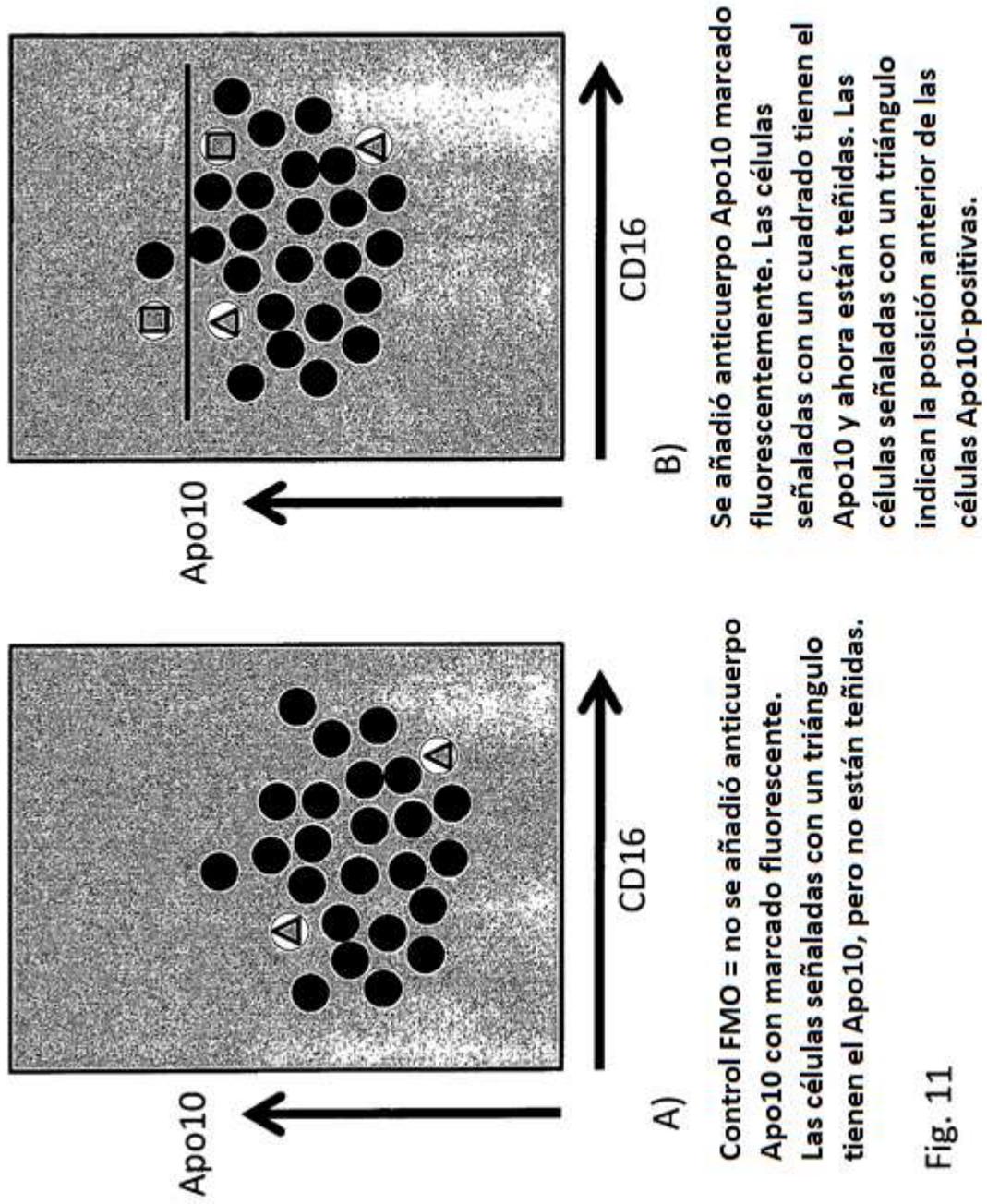
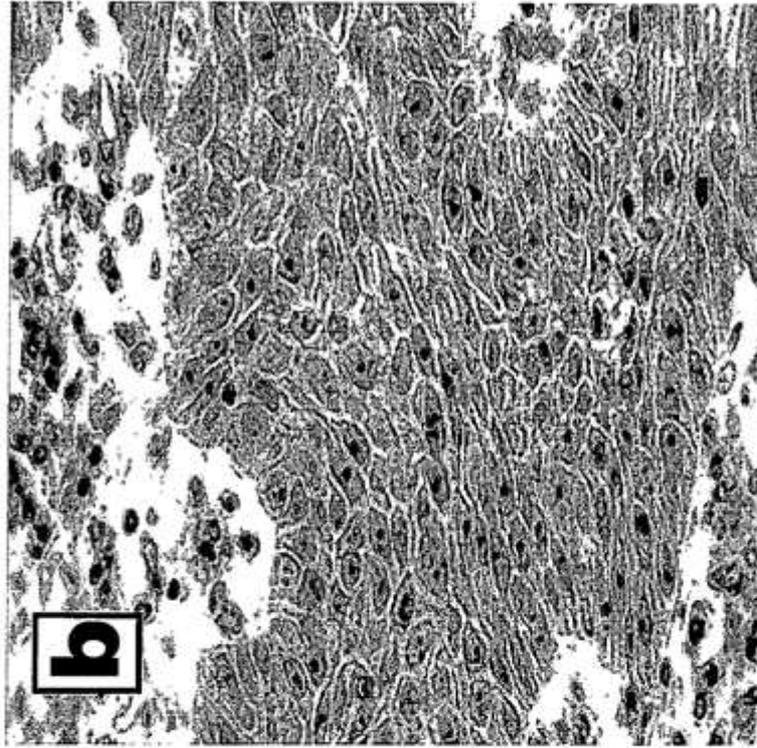
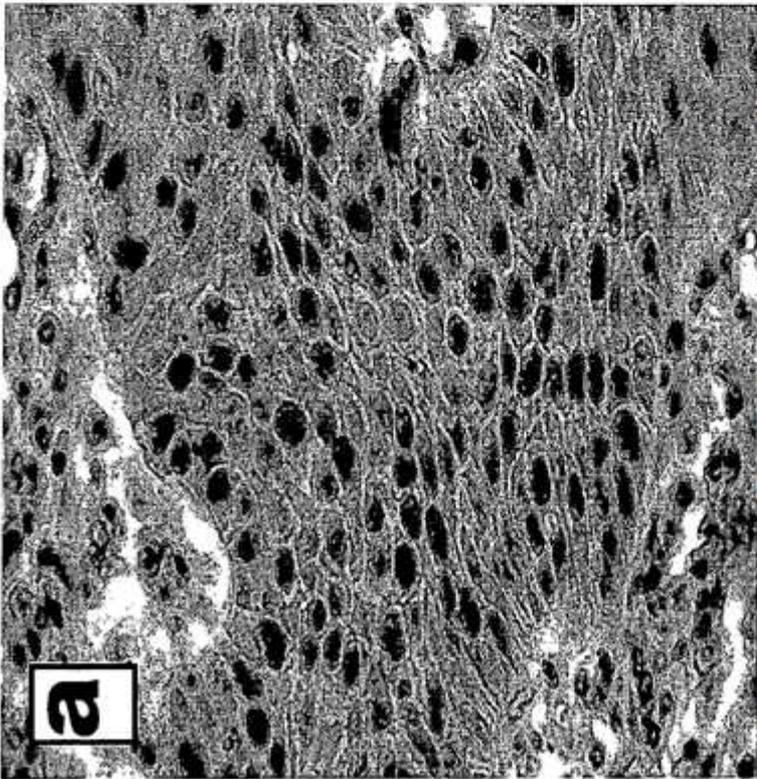


Fig. 11



b) Anticuerpo Apo10 bloqueado con péptido



a) Anticuerpo Apo10 no bloqueado

Fig. 12