(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 964 478**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2019 PCT/EP2019/086433**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2020 WO20127815**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2019 E 19821138 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2023 EP 3899534**

(54) Título: **Método para preservar las células urinarias**

(30) Prioridad:

19.12.2018 EP 18214037

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2024

(73) Titular/es:

CHARITÉ - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN (100.0%)
Charitéplatz 1
10117 Berlin, DE

(72) Inventor/es:

ENGHARD, PHILIPP;
FREUND, PAUL;
METZKE, DIANA y
SKOPNIK, CHRISTOPHER

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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 para preservar las células urinarias

[0001] La presente invención se refiere a un método para conservar y analizar células de orina.

Antecedentes de la invención

[0002] La citometría de flujo (clasificación de células activada por fluorescencia, FACS) es una potente tecnología que permite la cuantificación simultánea de varios antígenos a nivel de una sola célula. Esto se hace marcando los antígenos unidos a células con anticuerpos acoplados a fluorocromo. Este procedimiento se conoce como *tinción*. La orina de personas sanas normalmente está casi libre de leucocitos y otras células. Sin embargo, en diversas enfermedades renales se encuentran en la orina mayores cantidades de células renales e inmunitarias. El análisis de citometría de flujo de células urinarias humanas es una herramienta de diagnóstico prometedora para las enfermedades renales. Por ejemplo, la cantidad de células T en la orina indica el grado de inflamación en el tejido renal, mientras que las células epiteliales de los túbulos renales (TEC) son marcadores globales de estrés y daño renal. Se ha demostrado que el número de células T urinarias en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) se correlaciona con la afectación renal de la enfermedad, es decir, la nefritis lúpica (Clase III y IV), una complicación común y grave del LES. Esto también se aplica a los casos refractarios. En otras enfermedades renales como la lesión renal aguda (IRA), el rechazo de trasplante renal y la vasculitis ANCA, el análisis de citometría de flujo de las células urinarias como biomarcador ha mostrado resultados alentadores. Se cree que todas las enfermedades renales y urológicas pueden potencialmente controlarse mediante citometría de flujo de células urinarias. Por lo tanto, el uso de este método en la práctica clínica para el diagnóstico y el seguimiento de la terapia podría ser una adición útil a las pruebas de rutina actuales para las enfermedades renales.

[0003] Como hoy en día, se necesitan muestras de orina frescas de pacientes para permitir el análisis de citometría de flujo de las células urinarias, es decir, el tiempo entre la evacuación de una muestra de orina y una primera etapa de centrifugación no debe exceder las seis horas. Lo ideal es que el tiempo sea lo más breve posible. Este requisito se puede cumplir en hospitales grandes con la infraestructura adecuada, es decir, laboratorios para la preparación de muestras. Sin embargo, esto encarece el análisis y las clínicas más pequeñas, así como los consultorios médicos, quedan excluidos del envío de muestras. Para solucionar esta limitación logística, los inventores han desarrollado un método para conservar células urinarias directamente dentro de la orina.

[0004] Con base en lo anterior, es el objetivo de la presente invención proporcionar medios y métodos simples y confiables para preservar o conservar las células urinarias.

Resumen de la invención

[0005] La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

[0006] La presente invención tiene como objetivo proporcionar medios y métodos para conservar células en una muestra de orina de tal manera que sean estables durante más de 4 a 6 horas antes del análisis pero que también sean adecuadas para un análisis, por ejemplo mediante métodos basados en anticuerpos como FACS. El tratamiento de muestras según la invención permitiría el almacenamiento y/o transporte de una muestra de orina antes del análisis. La conservación no modifica las células de tal manera que no sea posible realizar una tinción significativa para el análisis de citometría de flujo.

[0007] Este objetivo se logra usando una sustancia tampón para ajustar y mantener el pH entre pH 6 y pH 8 y agregando un compuesto liberador de formaldehído a la muestra de orina. Las células que están presentes en la orina pueden detectarse o analizarse en un paso de análisis posterior. Un método adecuado para tal detección o análisis es FACS. Mediante el uso de combinaciones de anticuerpos específicas, se pueden detectar y cuantificar diferentes tipos de células, lo que permite la asignación a una condición saludable o una enfermedad o subtipo de enfermedad específica. También se puede controlar la progresión de una enfermedad o el progreso del tratamiento mediante los medios y métodos descritos en el presente documento.

[0008] Un primer aspecto de la invención se refiere a un método para analizar células urinarias. El método comprende los pasos de:

- contactar con una muestra de orina obtenida de un paciente con

  a. una sustancia tampón adecuada para crear y/o mantener un valor de pH en el rango de 6 a 8, en particular aprox. pH 7, dentro de dicha muestra de orina, y
  b. un compuesto liberador de formaldehído que produce una muestra de orina conservada,

- analizar células urinarias dentro de dicha muestra de orina conservada.

[0009] Otro aspecto de la invención se refiere a un método para diagnosticar una afección médica. El método comprende analizar células de orina dentro de una muestra de orina obtenida de un paciente con un método según el primer aspecto de la invención.

[0010] Otro aspecto más descrito en este documento pero que no forma parte de la invención se refiere a un recipiente adecuado para conservar células urinarias en una muestra de orina que comprende un compuesto liberador de formaldehído y una sustancia tampón capaz de mantener un pH en el intervalo de 6 a 8, en particular aprox. 7, en una muestra de orina.

Descripción detallada de la invención

Términos y definiciones

[0011] Para fines de interpretación de esta especificación, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando sea apropiado, los términos utilizados en singular también incluirán el plural y viceversa.

[0012] Los términos "que comprende", "que tiene", "que contiene" e "que incluye" y otras formas similares, y sus equivalentes gramaticales, tal como se usan en el presente documento, pretenden ser equivalentes en significado y de final abierto en el sentido de que un elemento o elementos que siguen a cualquiera de estas palabras no pretenden ser una lista exhaustiva de dicho elemento o elementos, ni deben limitarse únicamente al elemento o elementos enumerados. Por ejemplo, un artículo "que comprende" los componentes A, B y C puede consistir en (es decir, contener únicamente) los componentes A, B y C, o puede contener no sólo los componentes A, B y C sino también uno o más otros componentes. Como tal, se pretende y se entiende que "comprende" y formas similares del mismo, y sus equivalentes gramaticales, incluyen la divulgación de formas de realización de "que consiste esencialmente en" o "que consiste en".

[0013] Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro establecido o valor intermedio en ese rango indicado, está incluido dentro de la divulgación, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango indicado. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, también se incluyen en la divulgación los rangos que excluyen uno o ambos límites incluidos.

[0014] La referencia a "acerca de" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) variaciones que están dirigidas a ese valor o parámetro per se. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "acerca de X" incluye la descripción de "X".

[0015] Como se usa en el presente documento, incluidas las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "o" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0016] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Se utilizan técnicas estándar para métodos moleculares, genéticos y bioquímicos (ver en general, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª edición, John Wiley & Sons, Inc.) y métodos químicos.

[0017] El término "sustancia tampón" en el contexto de la presente especificación se utiliza en su significado conocido en la técnica; particularmente se refiere a un ácido o base débil y a una base o ácido conjugado. Una sustancia tampón adecuada para crear y/o mantener un valor de pH en el intervalo de 6 a 8 se caracteriza preferentemente por al menos un valor de pKA en el intervalo de 6 a 8.

[0018] El término "compuesto liberador de formaldehído" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere particularmente a un compuesto que libera formaldehído, particularmente lentamente pero no de manera espontánea, por ejemplo en presencia de agua o una solución tampón acuosa adecuada. Los compuestos liberadores de formaldehído adecuados se caracterizan por una liberación de formaldehído de hasta 20 mg/l, particularmente de 1 mg/l a 15 mg/l, más particularmente de 5 mg/l a 15 mg/l, una hora después de disolver el 0,1 % (p /v) del compuesto liberador de formaldehído en una solución acuosa (pH 7) a 25 °C. Los compuestos liberadores de formaldehído también se conocen comúnmente como liberadores de formaldehído. A los efectos de la presente especificación, el término "compuesto liberador de formaldehído" excluye el formaldehído y el paraformaldehído.

[0019] El término "células urinarias" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a células que se encuentran en la orina. El término también abarca células que no están presentes de forma natural en la orina, por ejemplo células cancerosas, etc. Las células urinarias son células de mamíferos, particularmente células humanas.

[0020] El objetivo se logra mediante un método según el primer, segundo o tercer aspecto de la invención y un recipiente según el cuarto aspecto de la invención. Las formas de realización preferidas se establecen en las reivindicaciones dependientes y en la siguiente descripción.

[0021] Un primer aspecto de la invención se refiere a un método para conservar células urinarias. El método comprende la etapa de:

- contactar con una muestra de orina obtenida de un paciente con

  a. una sustancia tampón adecuada para crear y/o mantener un valor de pH en el rango de 6 a 8 dentro de la muestra de orina y

  b. un compuesto liberador de formaldehído.

[0022] En determinadas formas de realización, la muestra de orina se pone en contacto simultáneamente con la sustancia tampón y el compuesto liberador de formaldehído o la muestra de orina primero se pone en contacto con la sustancia tampón y luego se añade el compuesto liberador de formaldehído.

[0023] En determinadas formas de realización, la muestra de orina se pone en contacto simultáneamente con la sustancia tampón y el compuesto liberador de formaldehído.

[0024] En determinadas formas de realización, la muestra de orina primero se pone en contacto con la sustancia tampón y luego se añade el compuesto liberador de formaldehído.

[0025] En determinadas formas de realización, el método consiste en la etapa de poner en contacto una muestra de orina obtenida de un paciente con una sustancia tampón adecuada para crear y/o mantener un valor de pH en el rango de pH 6 a pH 8 dentro de la muestra de orina y un compuesto liberador de formaldehído.

[0026] En determinadas formas de realización, la sustancia tampón es adecuada para crear y/o mantener un valor de pH en el intervalo de 6,9 a 7,4 dentro de la muestra de orina.

[0027] En determinadas formas de realización, dicha muestra de orina se pone en contacto con la sustancia tampón y el compuesto liberador de formaldehído a más tardar 6 h, 5 h, 4 h, 3 h, 2 h o 1 h después del muestreo, particularmente inmediatamente después del muestreo.

[0028] Preferiblemente, la sustancia tampón está en una concentración tal cuando se pone en contacto con la muestra de orina que dentro de la muestra de orina se forma el valor de pH deseado, por ejemplo, de 7,2 a 7,4, sin necesidad de ajuste adicional, por ejemplo, añadiendo adicionalmente un ácido o una base.

[0029] En determinadas formas de realización, el compuesto liberador de formaldehído se selecciona entre imidazolio urea (n.º CAS 39236-46-9), cloruro de cloroalilo de hexametilentetramina (n.º CAS 4080-31-3), diazolidinil urea (n.º CAS 78491-02-8)., 1,3-bis(hidroximetil)-5,5-dimetilimidazolidina-2,4-diona (DMDM hidantoína, n.º CAS 6440-58-01), 1-(hidroximetil)-5,5-dimetil-2,4- imidazolidindiona (MDM hidantoína) o hexametilentetramina (urotropina, n.º CAS 100-97-0).

[0030] En determinadas formas de realización, el compuesto liberador de formaldehído no es paraformaldehído.

[0031] En determinadas formas de realización, la sustancia tampón se selecciona entre ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), solución salina tamponada con fosfato (PBS), hidrogenocarbonato de sodio, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y 4-(2- ácido hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES).

[0032] En determinadas formas de realización, la sustancia tampón se selecciona entre ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), solución salina tamponada con fosfato (PBS) y ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico (HEPES).

[0033] En determinadas formas de realización, la sustancia tampón se proporciona en una solución tampón.

[0034] En determinadas formas de realización, la concentración de la sustancia tampón en la solución tampón está entre 0,2 mol/l y 5 mol/l.

[0035] En determinadas formas de realización, la concentración de la sustancia tampón en la solución tampón está entre 0,5 mol/l y 2 mol/l.

[0036] En determinadas formas de realización, la concentración de la sustancia tampón en la solución tampón es 1 mol/l.

[0037] En determinadas formas de realización, la muestra de orina se pone además en contacto con un compuesto quelante seleccionado entre ácido 2,2',2",2"'-(etano-1,2-diildinitrilo)tetraacético (EDTA), etilenglicol-bis (2-aminoetiléter) - ácido *N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA) y ácido 2,2',2"-nitrilotriacético (NTA).

[0038] En determinadas formas de realización, la muestra de orina se pone además en contacto con EDTA.

[0039] Para evitar la precipitación de formaldehído en la orina, se puede añadir la sustancia tampón a la muestra de orina antes de añadir el compuesto liberador de formaldehído.

[0040] En determinadas formas de realización, la muestra de orina se pone en contacto primero con la sustancia tampón y luego con el compuesto liberador de formaldehído.

[0041] Para lograr un equilibrio entre la preservación de las células en la muestra de orina y una tinción suficiente de anticuerpos en la etapa de análisis, la concentración final del compuesto liberador de formaldehído en la muestra conservada directamente después de la etapa de contacto está entre el 0,5 % (p/v) y 5 % (p/v). La conservación no modifica las células de tal manera que no sea posible realizar una tinción significativa para el análisis de citometría de flujo.

[0042] En determinadas formas de realización, la concentración final del compuesto liberador de formaldehído está entre el 0,5 % (p/v) y el 5 % (p/v).

[0043] En determinadas formas de realización, según la invención, la concentración final del compuesto liberador de formaldehído está entre el 1 % (p/v) y el 3 % (p/v).

[0044] En determinadas formas de realización, la concentración final del compuesto liberador de formaldehído es del 2 % (p/v).

[0045] Para mantener un pH entre pH 6 y pH 8 para evitar la precipitación de formaldehído en la orina como una masa similar a un gel, la concentración final de la sustancia tampón en la muestra conservada directamente después de la etapa de contacto está entre el 5 % (p/v) y 10 % (p/v).

[0046] En determinadas formas de realización, la concentración final de la sustancia tampón está entre el 5 % (p/v) y el 10 % (p/v).

[0047] En determinadas formas de realización, la concentración final de la sustancia tampón es del 7 % (p/v).

[0048] En determinadas formas de realización, la concentración final de la sustancia tampón está entre el 5 % (p/v) y el 10 % (p/v), particularmente el 7 % (p/v), y la concentración final del compuesto liberador de formaldehído entre 1 % (p/v) y 3 % (p/v).

[0049] La muestra conservada se puede almacenar a 4 °C hasta un mes antes de analizar las células. También es posible congelar la muestra conservada.

[0050] En determinadas formas de realización, la muestra conservada se almacena antes de analizar las células urinarias.

[0051] En determinadas formas de realización, la muestra conservada se almacena antes de analizar las células urinarias a una temperatura ≤ 10 °C, particularmente ≤ 4 °C.

[0052] En determinadas formas de realización, la muestra conservada se almacena antes de analizar las células urinarias a una temperatura entre -80 °C y 10 °C, particularmente -80 °C y 4 °C.

[0053] En determinadas formas de realización, la muestra conservada se almacena antes de analizar las células urinarias a una temperatura entre -20 °C y 10 °C, particularmente -20 °C y 4 °C.

[0054] Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para analizar células urinarias. El método comprende los pasos de:

- proporcionar una muestra de orina obtenida de un paciente,
- conservar la muestra de orina con un método de acuerdo con el primer aspecto de la invención o cualquier forma de realización de la misma, produciendo así una muestra de orina conservada, y
- analizar las células urinarias dentro de la muestra de orina conservada.

[0055] En determinadas formas de realización, el análisis comprende un análisis citométrico de las células urinarias en la muestra de orina conservada, por ejemplo, medición del tamaño celular, recuento celular, morfología celular (forma y

estructura), fase del ciclo celular, contenido de ADN, proteínas de la superficie celular, etc. En determinadas formas de realización, el análisis citométrico es o comprende un análisis de citometría de flujo, particularmente clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

[0056] Un tercer aspecto de la invención se refiere a un método para diagnosticar una afección médica. El método comprende analizar células urinarias en una muestra de orina obtenida de un paciente con un método según el segundo aspecto de la invención o cualquier forma de realización de la misma.

[0057] En determinadas formas de realización, la afección médica se selecciona entre nefritis lúpica, lesión renal aguda, rechazo después de un trasplante de riñón, vasculitis ANCA, nefropatía diabética, nefropatía por IgA, nefrolitiasis (cálculos renales) y cáncer de vejiga.

[0058] En determinadas formas de realización, la afección médica es nefritis lúpica y la presencia y/o cantidad de un marcador de superficie seleccionado entre CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, CCR7, CD14, CD36 se determina en las células urinarias dentro del muestra de orina conservada.

[0059] En determinadas formas de realización, la afección médica es el rechazo de un trasplante renal y la presencia y/o cantidad de un marcador de superficie seleccionado entre CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, CCR7, CD14, CD69, CD36, podocalixina, citoqueratina, CD10, CD13, EPCAM, CD227 se determina en las células urinarias dentro de la muestra de orina conservada.

[0060] En determinadas formas de realización, la afección médica es lesión renal aguda y la presencia y/o cantidad de un marcador de superficie seleccionado de CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, CCR7, CD14, CD36, podocalixina, citoqueratina, podocina (PDCN, SRN1) nefrina (NPHN, NPHS1), proteína del tumor de Wilms (WT1), CD10, CD13, EPCAM, CD227 se determina en las células urinarias dentro de la muestra de orina conservada.

[0061] En determinadas formas de realización, la afección médica es glomerulonefritis asociada a ANCA y la presencia y/o cantidad de un marcador de superficie seleccionado entre CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, CCR7, CD14, CD36, podocalixina, citoqueratina, CD10, CD13., EPCAM, CD227 se determina en las células urinarias dentro de la muestra de orina conservada.

[0062] Un cuarto aspecto que no forma parte de la invención se refiere a un recipiente adecuado para conservar células urinarias en una muestra de orina. El contenedor comprende

- un compuesto liberador de formaldehído, y
- una sustancia tampón capaz de crear y/o mantener a un pH en el rango de 6 a 8 en una muestra de orina.

[0063] En determinadas formas de realización, el recipiente comprende un volumen interior, en el que una composición está presente en dicho volumen interior y en el que la composición comprende, particularmente consiste en,

- un compuesto liberador de formaldehído seleccionado entre imidazolio urea, cloruro de cloroalilo de hexametilentetramina, diazolidinilurea, 1,3-bis(hidroximetil)-5,5-dimetilimidazolidina-2,4-diona, 1-(hidroximetil)-5,5-dimetil-2,4-imidazolidindiona o hexametilentetramina y
- una sustancia tampón capaz de mantener un pH en el rango de pH 6 a pH 8, en particular aprox. pH 7, en una muestra de orina.

[0064] En particular, el recipiente está configurado para recibir y contener un fluido, particularmente una muestra de orina.

[0065] En determinadas formas de realización, el recipiente es un tubo y comprende una abertura sellable, a través de la cual la muestra de orina puede transferirse al recipiente. Alternativamente, el recipiente puede ser un recipiente para orina. Preferiblemente, el paciente o el personal médico pueden añadir la muestra o muestra de orina inmediatamente al recipiente y almacenarlo directamente en el frigorífico después de invertirlo varias veces.

[0066] En determinadas formas de realización, el compuesto liberador de formaldehído y/o la sustancia tampón están presentes en el recipiente en forma sólida, por ejemplo, en forma de polvo, tabletas o granulado.

[0067] En determinadas formas de realización, el compuesto liberador de formaldehído se selecciona de imidazolio urea, cloruro de cloroalilo de hexametilentetramina, diazolidinilurea, 1,3-bis(hidroximetil)-5,5-dimetilimidazolidina-2,4-diona, 1-(hidroximetilo)-5,5-dimetil-2,4-imidazolidindiona o hexametilentetramina.

[0068] En determinadas formas de realización, el compuesto liberador de formaldehído no es paraformaldehído.

[0069] En determinadas formas de realización, la sustancia tampón se selecciona entre ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico, solución salina tamponada con fosfato, hidrogenocarbonato de sodio, tris(hidroximetil)aminometano y ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico.

[0070] En determinadas formas de realización, la sustancia tampón se selecciona entre ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico, solución salina tamponada con fosfato, hidrogenocarbonato de sodio y ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico.

[0071] En determinadas formas de realización, la relación entre la cantidad de liberador de formaldehído y la cantidad de sustancia tampón está entre 1:10 y 1:2, particularmente entre 1:5 y 2:5.

[0072] En determinadas formas de realización, la relación entre la cantidad de liberador de formaldehído y la cantidad de sustancia tampón es 2:7.

[0073] La invención se ilustra mejor mediante los siguientes ejemplos y figuras, de los que se pueden extraer formas de realización y ventajas adicionales. Estos ejemplos pretenden ilustrar la invención, pero no limitar su alcance.

Descripción de las figuras

[0074]

La Fig. 1 muestra la relación entre los valores de pH y formación de precipitados en la orina. Especialmente las muestras con valores de pH bajos tienden a formar precipitaciones. (A) Ejemplo de precipitación de orina del paciente con formaldehído añadido después de 22 horas (+/- 2 horas). (B) Resultados de la tira reactiva y relación con la precipitación de orina con formaldehído añadido después de 22 horas (+/- 2 horas)

La Fig. 2 muestra diagramas de puntos representativos de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) en la orina muestran una calidad de tinción reducida después de la incubación con tampón MOPS y formaldehído durante 22 horas (+/- 2 horas). Estrategia de activación de células T: puerta de dispersión de linfocitos. Selección de células T $CD3^+$. Discriminación Células T $CD4^+$ vs. Células T $CD8^+$. Estrategia de activación para macrófagos: puerta de dispersión de monocitos. Selección de macrófagos CD14+ CD36+. (A) PBMC frescas, completamente teñidas. (B) PBMC incubadas en orina con tampón MOPS y formaldehído al 1% durante 22 horas (+/- 2 horas)

La Fig. 3 muestra diagramas de puntos representativos de leucocitos urinarios. La calidad de la tinción y los porcentajes de poblaciones de muestra conservada después de 22 horas y muestra fresca son comparables. Estrategia de activación para células T: exclusión de desechos (FSC y SSC bajos) y eventos grandes (FSC y SSC muy altos). Selección de células T $CD3^+$. Discriminación células T $CD4^+$ vs. células T $CD8^+$. Estrategia de activación para macrófagos: exclusión de desechos (FSC y SSC bajos) y eventos grandes (FSC y SSC muy altos). Selección de macrófagos CD14+ CD36+. (A) Muestra fresca del paciente (<6 horas después de orinar), sin teñir. (B) Muestra fresca del paciente (<6 horas después de orinar), teñida. (C) Muestra de paciente conservada después de 22 horas (+/- 2 horas) a 4 °C, teñida.

La Fig. 4 muestra diagramas de puntos representativos de células epiteliales urinarias. La calidad de la tinción y los porcentajes de poblaciones de muestra conservada después de 22 horas y muestra fresca son comparables. Estrategia de activación para células epiteliales tubulares (TEC): exclusión de desechos (FSC y SSC bajos) y eventos muy grandes (FSC y SSC muy altos). Selección de células epiteliales (citoqueratina+). Discriminación TEC CD326+ (=EpCAM) y TEC CD10+ o CD13+. (A) Muestra de paciente fresca (<6 horas después de orinar), fijada y permeabilizada para tinción intracelular, tinción única para citoqueratina, control de isotipo para CD326, CD10 y CD13. (B) Muestra de paciente fresca (<6 horas después de orinar), fijada y permeabilizada para tinción intracelular, completamente teñida. (C) Muestra de paciente conservada después de 22 horas (+/- 2 horas) a 4 °C, seguida de permeabilización, completamente teñida.

La Fig. 5 muestra que la calidad de la tinción y los porcentajes de las poblaciones de leucocitos urinarios de la muestra conservada permanecen estables hasta por 6 días, mientras que las poblaciones de leucocitos en muestras de orina no fijadas desaparecen después de 6 días (ver Fig. 4 D). Estrategia de activación para células T: exclusión de desechos (FSC y SSC bajos) y eventos grandes (FSC y SSC muy altos). Selección de células T $CD3^+$. Discriminación Células T $CD4^+$ vs. Células T $CD8^+$. Estrategia de activación para macrófagos: exclusión de desechos (FSC y SSC bajos) y eventos grandes (FSC y SSC muy altos). Selección de macrófagos CD14+ CD36+. Se muestran gráficos FACS representativos. (A) Muestra de paciente conservada después de 22 horas (+/- 2 horas) a 4 °C. (B) Muestra de paciente conservada después de 3 días a 4 °C. (C) Muestra de paciente conservada después de 6 días a 4 °C. (D) Muestra del paciente sin conservación después de 6 días a 4 °C.

La Fig. 6 muestra que la calidad de la tinción y los porcentajes de poblaciones de células epiteliales urinarias de la muestra conservada permanecen estables hasta por 6 días, mientras que las poblaciones de células en

muestras de orina no fijadas casi desaparecen después de 6 días (ver Fig. 5 D). Estrategia de activación para células epiteliales tubulares (TEC): exclusión de desechos (FSC y SSC bajos) y eventos muy grandes (FSC y SSC muy altos). Selección de células epiteliales (citoqueratina+). Discriminación TEC CD326+ (=EpCAM) y TEC CD10+ o CD13+. Se muestran gráficos FACS representativos. (A) Muestra de paciente conservada después de 22 horas (+/- 2 horas) a 4 °C. (B) Muestra de paciente conservada después de 3 días a 4 °C. (C) Muestra de paciente conservada después de 6 días a 4 °C. (D) Muestra del paciente sin conservación después de 6 días a 4 °C.

La Fig. 7 muestra que los recuentos celulares totales de las poblaciones de células epiteliales y leucocitos urinarios analizados permanecen estables durante 22 horas, 3 días, 6 días o potencialmente incluso más cuando se conservan y almacenan a 4 °C. Cada punto representa el número absoluto de células de cada paciente en ambas condiciones (es decir, los tiempos de almacenamiento). La línea diagonal indica cantidades de celda idénticas (pendiente = 1) en ambas condiciones, por lo tanto, los puntos en esta línea o cerca de ella representan mediciones con números de celda iguales o muy similares en ambas condiciones. (Columna A) Recuentos totales de células de muestras de orina frescas de pacientes (< 6 horas después de la micción) y de un volumen equivalente de muestras de orina de pacientes conservadas después de 22 horas (+/- 2 horas) a 4 °C. (Columna B) Recuentos totales de células de muestras de orina de pacientes conservadas después de 22 horas (+/- 2 horas) a 4 °C y de un volumen equivalente de muestras de orina de pacientes conservadas después de 3 días a 4 °C. (Columna C) Recuentos totales de células de muestras de orina de pacientes conservadas después de 22 horas (+/- 2 horas) a 4 °C y de un volumen equivalente de muestras de orina de pacientes conservadas después de 6 días a 4 °C.

La Fig. 8 muestra la conservación de células en la orina. A. Gráficos representativos de citometría de flujo de tinción en células frescas y después de 20 h de conservación. No se observa ningún deterioro cualitativo de la tinción. B. Comparación del número de células en la orina en la muestra recién medida y después de 24 horas de conservación, cada punto representa una muestra. La línea gris muestra números de celda absolutamente idénticos, la línea discontinua muestra el análisis de regresión de los valores realmente medidos. Existe un alto grado de coincidencia, es decir, un recuento de células casi constante a pesar de la conservación.

La Fig. 9 muestra la cinética de la fijación de células inmunes usando IU. Se muestra el porcentaje de células fijadas en comparación con las células fijadas utilizando un kit de fijación de células comercial. Las células se incubaron con IU durante 5 min, 30 min, 1 h, 5 h y 24 h. Los experimentos se realizaron en réplicas.

La Fig. 10 muestra células T $CD4^+$ como biomarcadores de nefritis lúpica (NL) activa. A. Correlación del recuento de células T $CD4^+$ por 100 ml de orina con la actividad de la enfermedad (medida como SLEDAI). Cada cuadrado abierto representa un paciente con LES sin afectación renal, los círculos rellenos representan un paciente con LES con afectación renal conocida. B. Comparación de la cantidad de células T $CD4^+$ en la orina con una biopsia renal simultánea. Todos los pacientes con NL inflamatoria (NL proliferativa) muestran niveles elevados de células T en la orina. C. Curva ROC para la detección de NL proliferativa/inflamatoria en pacientes con LES utilizando la cantidad de células T $CD4^+$ en orina (sensibilidad del 100% y especificidad del 98,0%). D. Los pacientes que normalizan sus recuentos de células T $CD4^+$ bajo terapia muestran una reducción significativa de la actividad de su enfermedad, los pacientes con recuentos de células T $CD4^+$ persistentes o crecientes en la orina no muestran ninguna reducción de la actividad de su enfermedad. E. Los pacientes con células T $CD4^+$ normalizadas en orina tienen un mejor incremento de creatinina después de seis meses de tratamiento que los pacientes con persistencia de células T en orina. F. El recuento de células T $CD4^+$ efectoras/memoria (EM) predice la respuesta a la terapia después de 6 meses de terapia de inducción.

La Fig. 11 muestra diferentes poblaciones de células en la orina como marcadores de rechazo agudo de trasplante de riñón. A. Gráficos representativos de citometría de flujo para la detección de células T (CD3, CD4, CD8), macrófagos (CD45, CD36, CD14), células positivas para podocalixina (PDX, como sustituto de podocitos) y células epiteliales de los túbulos renales (TEC; citoqueratina, CD10, EPCAM) B. Cantidad de células T en relación con las células TEC y PDX+ en pacientes con rechazo celular agudo (ACR), rechazo humoral (HRX), pacientes con degeneración del injerto sin rechazo (No Rx) y pacientes con función estable del injerto (Contr.). C. Las curvas ROC muestran una buena importancia diagnóstica de la combinación de células T y TEC o células PDX+ en orina (AUC 0,9). Línea negra: comparación de pacientes con rechazo con el grupo No RX; Línea gris: datos que incluyen pacientes con contraste con función estable del injerto. SSC=dispersión lateral; FSC=dispersión hacia adelante; DAPI=tinte de células muertas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preservación y análisis de células de orina.

[0075] La fijación de células y tejidos con agentes tales como formaldehído se considera una práctica rutinaria en los laboratorios. La base de esta fijación es la reticulación de proteínas en ciertos aminoácidos.

[0076] Al añadir formaldehído directamente a la orina de pacientes, los inventores observaron la precipitación de una masa similar a un gel en un número significativo de muestras después de aproximadamente 22 horas, haciendo así imposible analizar las muestras al día siguiente. Los resultados de las tiras reactivas de las muestras de orina del paciente sugieren que especialmente las muestras con pH bajo tienden a formar precipitaciones (Fig. 1).

[0077] Siguiendo el supuesto de que el pH bajo desencadena la precipitación, los inventores añadieron un tampón de cultivo celular estándar (MOPS) a las muestras de orina junto con formaldehído. Al estabilizar el pH más cerca de la neutralidad, los inventores pudieron evitar la precipitación. También se probaron otras estrategias de neutralización, por ejemplo, la dilución con agua destilada u otros tampones (PBS), pero dieron como resultado más precipitación o peor calidad en el análisis FACS en comparación con el tampón MOPS en las condiciones correspondientes.

[0078] Sin embargo, la incubación de la muestra de orina con formaldehído y tampón MOPS durante al menos 20 horas dio como resultado una calidad de tinción deficiente con una separación disminuida de células positivas y negativas (Fig. 2) y, por lo tanto, una disminución de las células detectables.

[0079] Para lograr una fijación más suave de las células, los inventores introdujeron a continuación liberadores de formaldehído tales como, entre otros, imidazolidinil urea (IU) en lugar de la adición directa de formaldehído. El grupo químico de los liberadores de formaldehído se utiliza, por ejemplo, como conservante en productos cosméticos y se caracteriza por una liberación lenta de grupos formaldehído a partir de una molécula más compleja. Al utilizar este agente químico, la calidad de la tinción sólo se vio ligeramente afectada en comparación con muestras de orina frescas (Figs. 3 - 6). Por lo tanto, los inventores pudieron detectar recuentos similares de células urinarias después de 22 horas (+/- 2 horas) en comparación con muestras frescas (Figura 7A). Además, se detectaron cantidades similares de células urinarias incluso después de 3 y 6 días en comparación con las muestras analizadas después de 1 día (Figura 7B y 7C).

[0080] Se añaden tampón MOPS líquido e imidazolidinilurea en polvo en concentraciones correspondientes (ver 2d) a la muestra de orina. Al invertir la muestra varias veces, el polvo (IU) se disuelve y todos los componentes se mezclan suficientemente. Posteriormente, la muestra se puede almacenar a 4 °C durante 22 horas, 3 días, 6 días o potencialmente incluso más para la preparación posterior de la muestra, es decir, tinción de células basada en anticuerpos y análisis de citometría de flujo.

[0081] El método de la invención permite la preparación de muestras retrasada y el análisis de células urinarias humanas mediante un procedimiento de conservación sencillo. Ambos componentes (IU y tampón MOPS) simplemente se añaden a la muestra de orina. Después de invertir la muestra varias veces, se puede conservar en el frigorífico (4 °C) durante 22 horas, 3 días, 6 días o incluso más. Esto permite un análisis centralizado y estandarizado que facilita los estudios multicéntricos, así como el uso diagnóstico futuro en clínicas más periféricas y atención ambulatoria. Otra ventaja importante del método de la invención es una mayor seguridad cuando se trabaja con muestras humanas, ya que las células morirán después de la fijación. Además, el procedimiento de conservación conduce a la fijación de las células, lo que permite comenzar directamente con la permeabilización para la tinción intracelular después de una etapa de centrifugación.

[0082] Hasta ahora, los inventores han analizado 15 muestras para recuentos de células T (que tiñen positivas para CD3 y CD4 o CD3 y CD8) y macrófagos (positivos para CD14 y CD36) y 9 muestras para recuentos de células epiteliales tubulares derivadas de riñón (positivas para citoqueratina y CD326 (EpCAM) o citoqueratina y CD10 y CD13), respectivamente, después de 22 horas (+/- 2 horas). Para puntos de tiempo después de 3 días y 6 días, los inventores adquirieron datos de 10 muestras tanto para células T como para células epiteliales tubulares, respectivamente.

[0083] Cada muestra de orina se dividió en partes iguales, lo que permitió comparar los recuentos de células del método de conservación de la invención después de un cierto tiempo con una muestra de referencia. Las muestras conservadas almacenadas durante 22 horas (+/- 2 horas) a 4 °C se relacionaron con una muestra recién preparada y se analizaron directamente al recibirlas. Las muestras conservadas almacenadas durante 3 días o 6 días a 4 °C se refirieron a muestras conservadas de la misma manera con el método de la invención y almacenadas durante 22 horas (+/- 2 horas) a 4 °C antes de la tinción y el análisis.

[0084] Se adquirieron muestras de pacientes con diversas patologías renales, incluyendo: lesión renal aguda (IRA), nefropatía diabética, rechazo agudo de un trasplante de riñón, granulomatosis con poliangeítis (GPA) con afectación renal, lupus eritematoso sistémico (LES) con afectación renal. Afectación, Glomerulonefritis Rápidamente Progresiva (GNPR), Nefropatía IgA.

[0085] Una comparación de los recuentos celulares totales para las muestras de cada punto temporal y las muestras de referencia correspondientes se presenta en la Figura 7.

[0086] Es posible que el método reivindicado en este documento pueda aplicarse en el diagnóstico y seguimiento de diversas enfermedades renales. Hasta el momento, se describió el análisis de células urinarias para las siguientes entidades:

- nefritis lúpica
- lesión renal aguda
- rechazo después del trasplante de riñón
- vasculitis ANCA
- nefropatía diabética
- nefropatía por IgA
- cálculos renales (nefrolitiasis)
- cáncer de vejiga

[0087] Considerando la variedad de afecciones médicas, es probable que el método según la invención pueda usarse para cualquier enfermedad renal o urológica o cualquier enfermedad que conduzca a una composición celular alterada en la orina.

Métodos y materiales

[0088]

Concentración imidazolidinil urea: 20 mg/ml de volumen total (Orina + MOPS)

Concentración tampón MOPS: 1 mol/l

Composición tampón MOPS (1 mol/l, para 100 ml):

- 20,95 g MOPS

- 0,82 g de acetato de sodio anhidro (anhidrita NaAc)

- 1,85 g de EDTA

- Llenar hasta 100 ml con Aqua dest.

- Ajustar el pH a 7 con NaOH

Tampón de pH MOPS: 7

Proporción de tampón MOPS del volumen total: 1:3

Proporción de orina del volumen total: 2:3

Se mezclaron 60 ml de orina, 30 ml de tampón y 1800 mg de imidazolidinilurea (IU). La concentración final de IU fue de 20 g/l.

Ejemplo 2: Establecimiento de un sistema de conservación de muestras

[0089] Actualmente, se requiere una muestra de orina fresca para el análisis de citometría de flujo de las células de la orina (máximo 4-6 h después de la recolección de la muestra), lo que dificulta la logística de la muestra. El análisis de muestras frescas requiere un transporte inmediato de la muestra y debe estar disponible para el análisis personal de laboratorio debidamente capacitado y capacidades de instrumentos. En clínicas grandes, con el máximo cuidado, un ensayo basado en muestras frescas es factible, pero hace que el análisis sea costoso. Es casi imposible utilizarlo en hospitales más pequeños o clínicas ambulatorias. Actualmente, no existe una logística de muestras establecida para conservar células de orina para su posterior análisis por citometría de flujo. Por ello, los inventores han desarrollado un método de conservación que conserva las células en un recipiente especial durante al menos 6 días. La dificultad en este caso no era sólo conservar las células, sino también no modificarlas de tal manera que después de la conservación no fuera posible realizar una tinción significativa para citometría de flujo. Además, el sistema de conservación debe ser lo más sencillo y sencillo posible para que sea aceptado por los usuarios (personal médico en funcionamiento rutinario). Combinando una sustancia tampón y un compuesto liberador de formaldehído en un proceso de dos pasos, los inventores lograron conservar las células durante al menos seis días. Todo lo que se requiere es agregar una muestra de orina a un recipiente que contenga un tampón y luego agregar un compuesto liberador de formaldehído (en forma de polvo o tableta).

Alternativamente, el recipiente está equipado con el compuesto tampón y el compuesto liberador de formaldehído de manera que permita una vida útil estable para ambos, y la muestra de orina se añade, opcionalmente después de la adición de agua, al abrir el recipiente de su embalaje.

[0090] A continuación, la muestra se puede almacenar y/o transportar. Con esta conservación, se puede realizar tinción y citometría de flujo de las células sin comprometer la calidad del análisis. Una comparación del análisis de orina fresca y después de uno, tres o seis días de conservación mostró recuentos de células casi idénticos y una correlación lineal de los recuentos de células medidas (correlación de Pearson para $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ y TEC proximal y distal, p. <0,001 para todos, r = 0,9530 - 0,9998, mediana r 0,9982, Fig. 8).

[0091] El sistema es fácil de usar y no requiere un protocolo complicado o que requiere mucho tiempo.

[0092] Es fácil de implementar dentro de 30 segundos, lo cual es el requisito previo para la implementación práctica.

Ejemplo 3: comparación con protocolos publicados de preservación celular

[0093] El documento WO 2014/029791 A1 muestra un análisis de citometría de flujo de células que han sido tratadas con diferentes variantes de un protocolo de fijación. Se usaron los siguientes reactivos para preservar las células y cada solución de A a E se diluyó 1:50 con la muestra de células:

A. 25 % p/v de diazolidinilurea
B. 1,5% p/v de ácido aurintricarboxílico
C. 0,8 % p/v de fluoruro de sodio
D. 10% p/v de EDTA
E. 4,5% p/v de gliceraldehído

[0094] Las variantes mencionadas para la conservación de células se compararon con el protocolo según la invención, es decir, las soluciones A a E se diluyeron respectivamente 1:50 con orina. El ácido aurintricarboxílico precipita rápidamente cuando se añade a la orina, haciéndola inutilizable para los fines del protocolo de la presente invención. También el EDTA solo (0,2 % de concentración final) precipita en la orina.

[0095] Los otros tres ingredientes (gliceraldehído, diazolidinilurea y fluoruro de sodio) se probaron en la concentración proporcionada en el documento WO 2014/029791 A1 para la conservación de células de orina en tres muestras de orina de pacientes y se compararon con el protocolo. Para las tres sustancias, la calidad de la tinción en el análisis de citometría de flujo se deterioró significativamente.

Ejemplo 4: Cinética de fijación de células inmunes usando IU

[0096] IU se realizó con diferentes tiempos de incubación: 5 min, 30 min, 1 h, 5 h, 1 día. Posteriormente, se realizó la permeabilización usando Perm/lavado (las células no fijadas tendrían que romperse). La medición y el recuento de células se realizaron en MACSquant seguido de la evaluación mediante SSC/FSC y ZZ.

Controles: positivos: células fijadas con PFA; negativos: células no fijadas.

[0097] Después de 5 h de incubación, se fijaron todas las células replicadas, el 100%. El protocolo según la invención produjo incluso mayores cantidades de células recuperadas en comparación con el kit comercial, por lo que se observaron valores >100%.

Ejemplo 5: células T como biomarcadores de nefritis lúpica

[0098] Nefritis lúpica (NL) es una de las complicaciones más comunes y graves del lupus eritematoso sistémico (LES). Con el tratamiento estándar con ciclofosfamida o micofenolato de mofetilo (MMF), existe el riesgo de que se produzcan efectos secundarios graves, como infecciones graves en condiciones de inmunosupresión. Por otro lado, como se ha demostrado repetidamente en los estudios, sólo alrededor del 45% de los pacientes logran la remisión completa bajo tratamiento, lo que implica una morbilidad significativa. Además, la actividad incontrolada de la enfermedad y los efectos secundarios de la terapia provocan repetidamente la muerte. Los biomarcadores podrían ayudar eficazmente a mejorar el pronóstico de la NL mediante un diagnóstico temprano y una terapia individualizada basada en una mejor evaluación del pronóstico y control de la terapia.

[0099] En una cohorte de 147 pacientes con LES y 186 muestras de orina, los inventores pudieron demostrar que la cantidad de células T $CD4^+$ en la orina identificaba a pacientes con nefritis lúpica activa con alta sensibilidad (100%) y especificidad (98%). (Fig. 9. área debajo de la curva ROC, AUC 0,99). Los pacientes con LES sin afectación renal apenas mostraron células T en la orina, incluso con una mayor actividad de la enfermedad, y los pacientes con LES con afectación renal conocida pero sin una mayor actividad de la enfermedad mostraron solo unas pocas células T en la orina. Por el contrario, todos los pacientes con nefritis lúpica proliferativa (la forma más común de NL) tenían niveles elevados de

células T en la orina. Curiosamente, en los pocos pacientes con NL activa y no proliferativa (como NL de clase I o V), apenas se observaron células T que pudieran usarse para diferenciar las subclases de NL individuales. En la cohorte investigada de 147 pacientes con LES, la determinación de células T en orina fue claramente superior a los marcadores habituales como la creatinina, la proteinuria y el sedimento urinario.

[0100] Aún más interesante para uso clínico es el hecho de que la cantidad de células T en la orina durante el curso de la terapia permite una correlación con la respuesta al tratamiento en una etapa temprana. Sería posible una adaptación temprana de la terapia en el sentido de un tratamiento personalizado con la ayuda de biomarcadores.

[0101] En una pequeña cohorte de pacientes con LES, los inventores también pudieron demostrar que la cantidad de células T efectoras/de memoria (células T EM) en la orina en el momento del diagnóstico puede predecir la respuesta a la terapia 6 meses después. Todos los pacientes con una mayor frecuencia de células T EM no mostraron respuesta después de la terapia de inducción.

[0102] En resumen, la nefritis lúpica puede i) diagnosticarse con células T en la orina, ii) monitorizarse la respuesta al tratamiento y iii) estimarse el pronóstico.

Ejemplo 6: Combinación de células T y células epiteliales de túbulos para el diagnóstico de rechazo de trasplante de riñón

[0103] El transplante de riñón es probablemente la mejor terapia para la insuficiencia renal terminal. Sin embargo, el rechazo agudo del trasplante es una preocupación constante que requiere el uso permanente de inmunosupresores y un seguimiento regular de la función del injerto. Actualmente no existen marcadores no invasivos fiables para el rechazo agudo del trasplante, por lo que si se sospecha se debe realizar una biopsia de riñón con los correspondientes riesgos.

[0104] En una cohorte de 63 pacientes con trasplante de riñón, se investigó la cantidad de diferentes células inmunitarias (células T $CD4^+$ y $CD8^+$, monocitos/macrófagos), así como células epiteliales del túbulo renal (TEC proximales y distales) y podocitos (células PDX+). En 39 de los pacientes examinados se realizó una biopsia de riñón debido a un deterioro de la función de NTX y los resultados se compararon directamente con el resultado de la biopsia como estándar de oro. Además, se examinaron como grupos de control 24 pacientes con función estable de NTX. Combinando la cantidad de células T (cantidad total de células T o células T $CD4^+$ o $CD8^+$) y TEC en la orina como proporción de células T/TEC, se logró una buena separación de pacientes con y sin rechazo (Fig. 10, área por debajo de la curva ROC 0,90). En una cohorte de 64 pacientes con trasplante de riñón en un escenario clínicamente muy relevante, una combinación de células T y células epiteliales de los túbulos en la orina mostró buena sensibilidad y especificidad (Fig. 10, área debajo de la curva ROC 0,90).

Ejemplo 7: Más datos en otras enfermedades

[0105] En pacientes con insuficiencia renal aguda (ANV), se demostró que la cantidad de TEC en la orina se correlacionaba con la extensión del daño renal (medido como estadio ANV). Además, se podrían detectar células similares a células madre en la orina de pacientes con ANV, lo que sólo ocurrió en pacientes que se recuperaban de ANV (posibles marcadores de regeneración).

[0106] En pacientes con glomerulonefritis asociada con ANCA, similar a NL, se demostró que la cantidad de células T en la orina es un biomarcador de inflamación renal activa.

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar células urinarias, comprendiendo el método las etapas de:

- poner en contacto una muestra de orina obtenida de un paciente con

a. una sustancia tampón adecuada para crear y/o mantener un valor de pH en el rango de 6 a 8, dentro de dicha muestra de orina, y
b. un compuesto liberador de formaldehído que produce una muestra de orina conservada,

- analizar células urinarias dentro de dicha muestra de orina conservada
en el que la concentración final del compuesto liberador de formaldehído está entre el 1 % (p/v) y el 3 % (p/v), y en el que dicho análisis comprende un análisis de citometría de flujo.

2. El método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra de orina se pone en contacto con dicha sustancia tampón y dicho compuesto liberador de formaldehído a más tardar 6 h, 5 h, 4 h, 3 h, 2 h o 1 h después del muestreo.

3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho compuesto liberador de formaldehído se selecciona de imidazolio urea, cloruro de cloroalilo de hexametilentetramina, diazolidinilurea, 1,3-bis(hidroximetil)-5,5-dimetilimidazolidina-2,4-diona, 1-(hidroximetil)-5,5-dimetil-2,4-imidazolidindiona o hexametilentetramina.

4. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha sustancia tampón se selecciona de ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico, hidrogenocarbonato de sodio salino tamponado con fosfato, tris(hidroximetil)aminometano y ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico.

5. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sustancia tampón se proporciona en una solución tampón.

6. El método según cualquiera de las anteriores reivindicaciones, en las que la muestra de orina se pone en contacto primero con la sustancia tampón y, a continuación, con el compuesto liberador de formaldehído.

7. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración final de la sustancia tampón está entre el 5 % (p/v) y el 10 % (p/v).

8. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra conservada se almacena antes de analizar las células urinarias a una temperatura ≤ 10 °C.

9. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho análisis de citometría de flujo comprende FACS.

10. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración final del compuesto liberador de formaldehído es del 2 % (p/v).

11. Un método para diagnosticar una afección médica, comprendiendo el método analizar células de orina dentro de una muestra de orina obtenida de un paciente con un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. El método según la reivindicación 11, en el que dicha afección médica se selecciona entre nefritis lúpica, lesión renal aguda, rechazo después de un trasplante de riñón, vasculitis ANCA, nefropatía diabética, nefropatía por IgA, nefrolitiasis y cáncer de vejiga.

Fig. 1

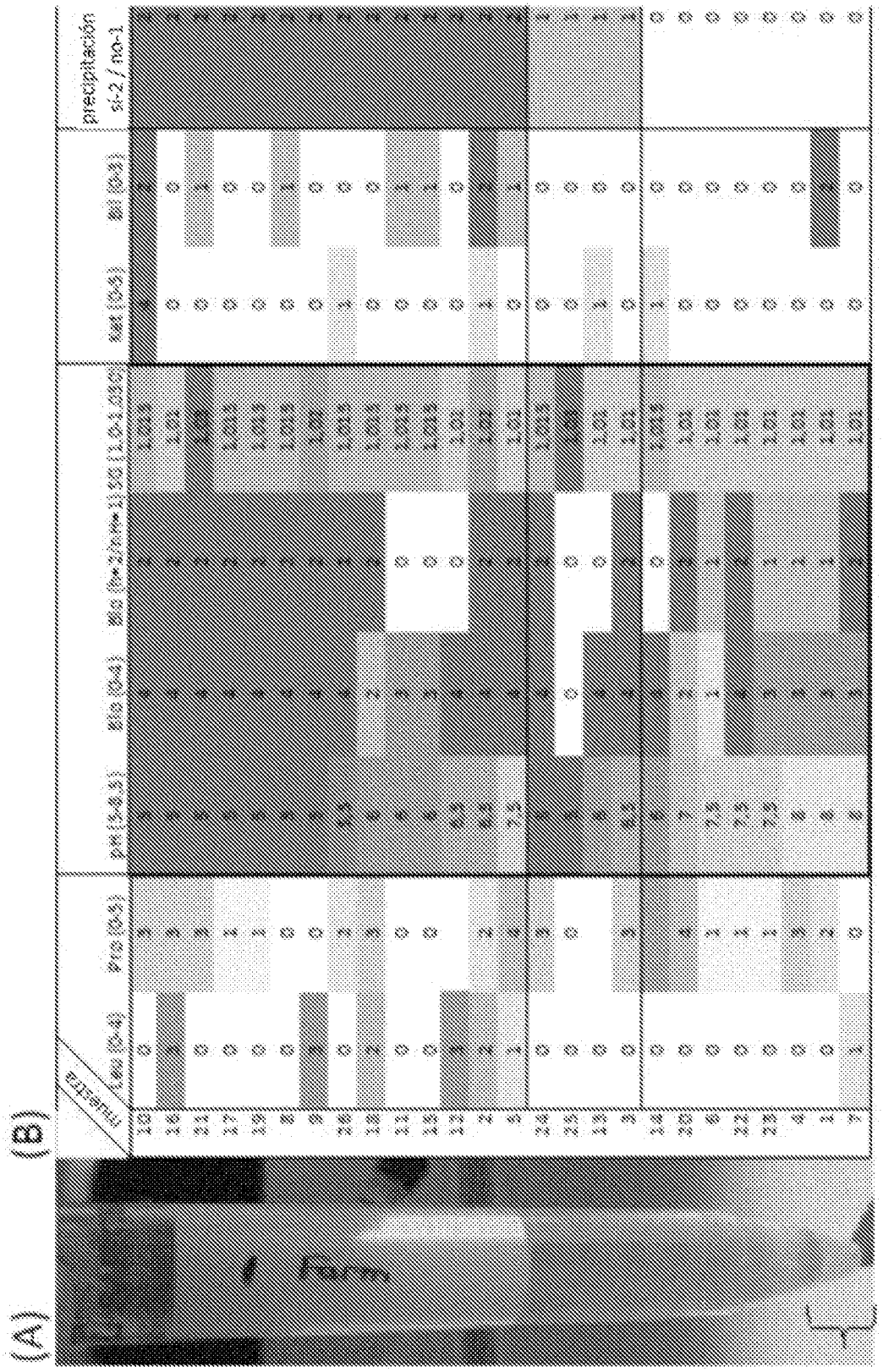


Fig. 2

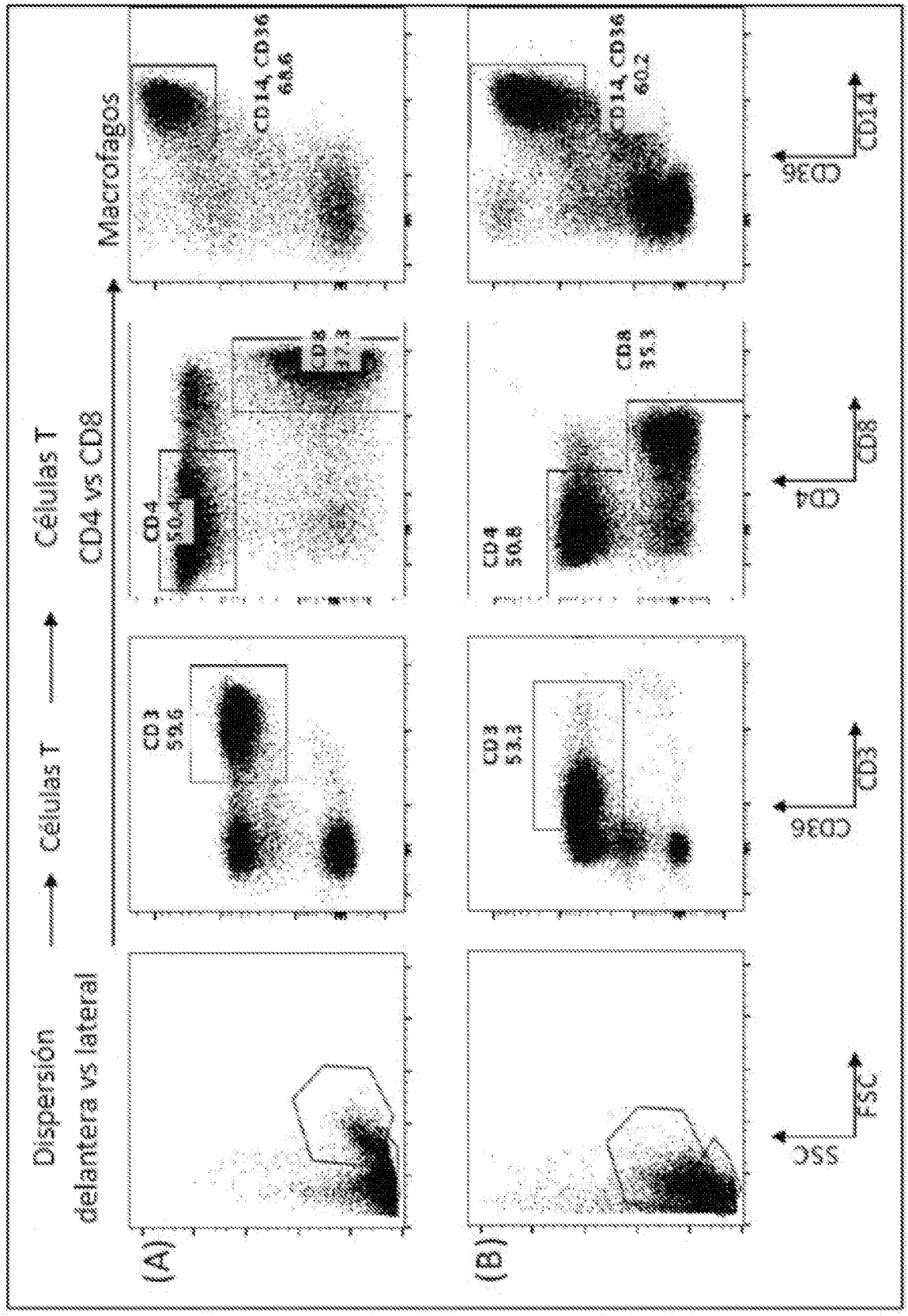

Dispersión
delantera vs lateral
Células T
Células T
CD4 vs CD8
Macrofagos
(A)
(B)
CD3
59.6
CD4
50.4
CD8
27.3
CD14, CD16
68.6
CD3
53.3
CD4
50.8
CD8
35.3
CD14, CD16
60.2
SSC
FSC
CD3
CD36
CD4
CD8
CD14
CD36

Fig. 3

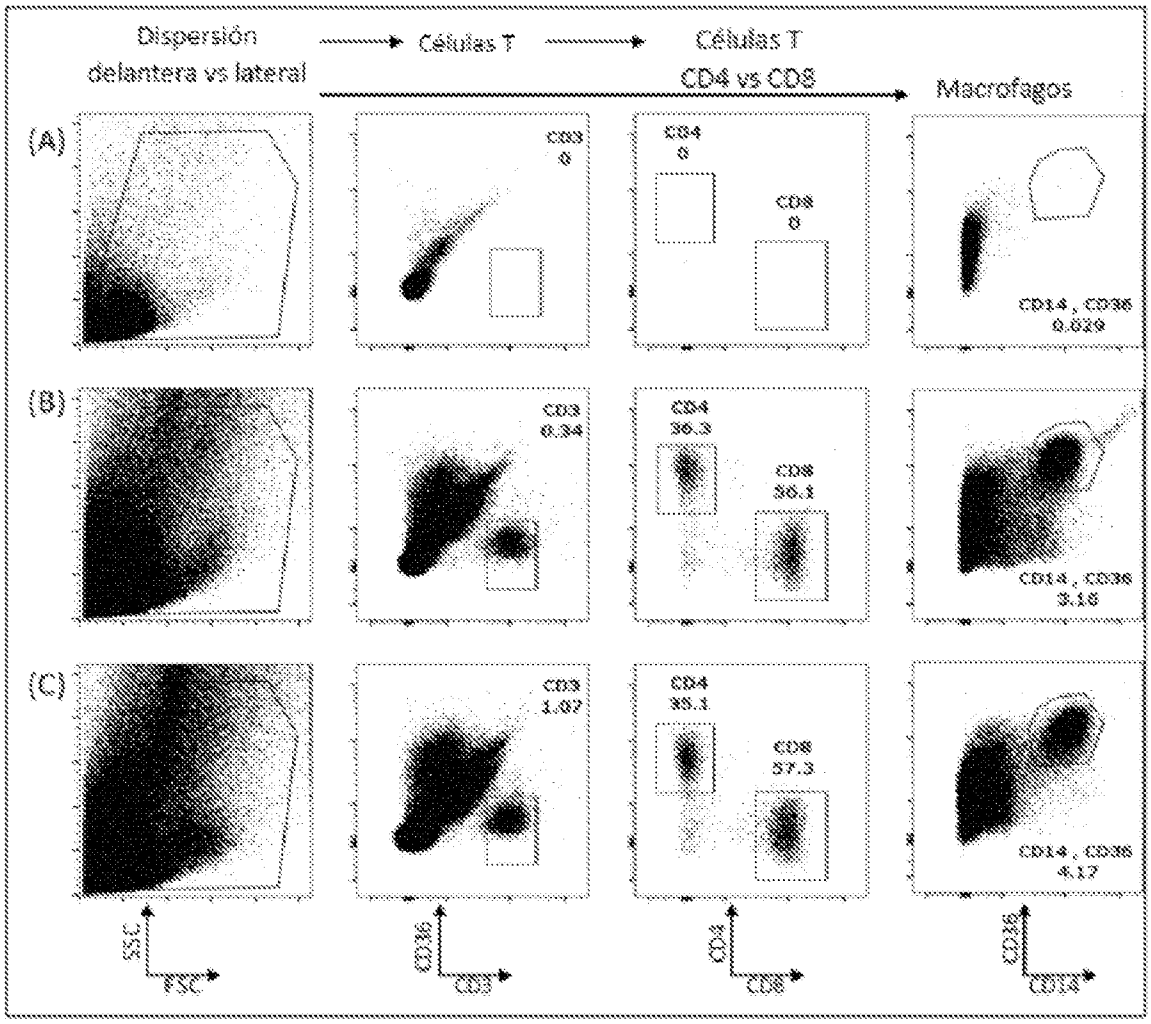

Dispersión delantera vs lateral
Células T
Células T CD4 vs CD8
Macrofagos
(A)
(B)
(C)
CD3 0
CD4 0
CD8 0
CD14 , CD36 0.029
CD3 6.34
CD4 56.3
CD8 36.1
CD14 , CD36 3.18
CD3 1.07
CD4 85.1
CD8 57.3
CD14 , CD36 4.17
SSC
FSC
CD36
CD3
CD4
CD8
CD36
CD14

Fig. 4

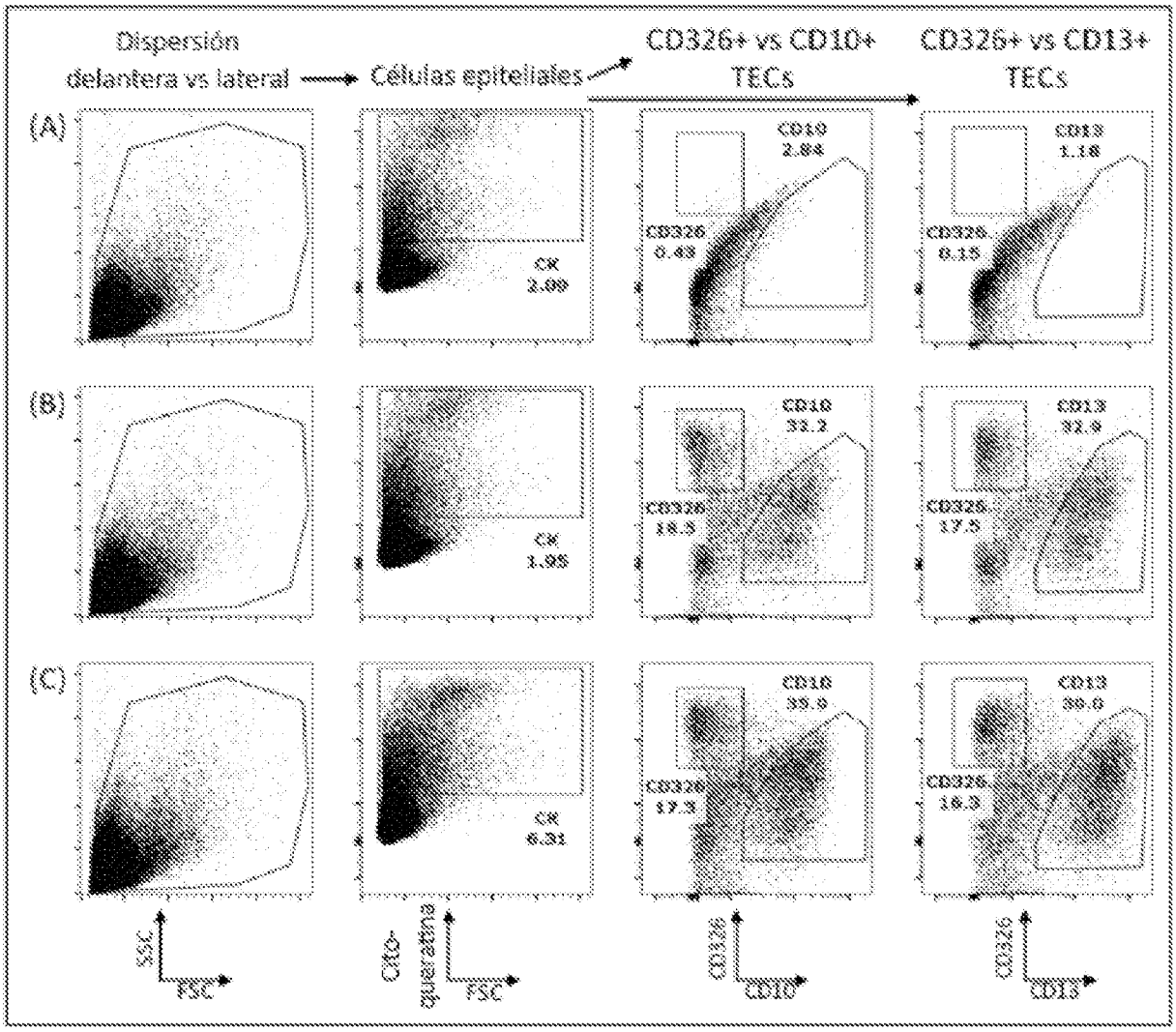

Dispersión
delantera vs lateral
Células epiteliales
CD326+ vs CD10+
TECs
CD326+ vs CD13+
TECs
(A)
(B)
(C)
CK
2.09
CD10
2.84
CD326
0.43
CD13
1.18
CD326
0.15
CK
1.95
CD10
31.2
CD326
18.5
CD13
32.9
CD326
17.5
CK
6.31
CD10
39.9
CD326
17.3
CD13
30.0
CD326
16.3
SSC
FSC
Cito-
queratina
FSC
CD326
CD10
CD326
CD13

Fig. 8

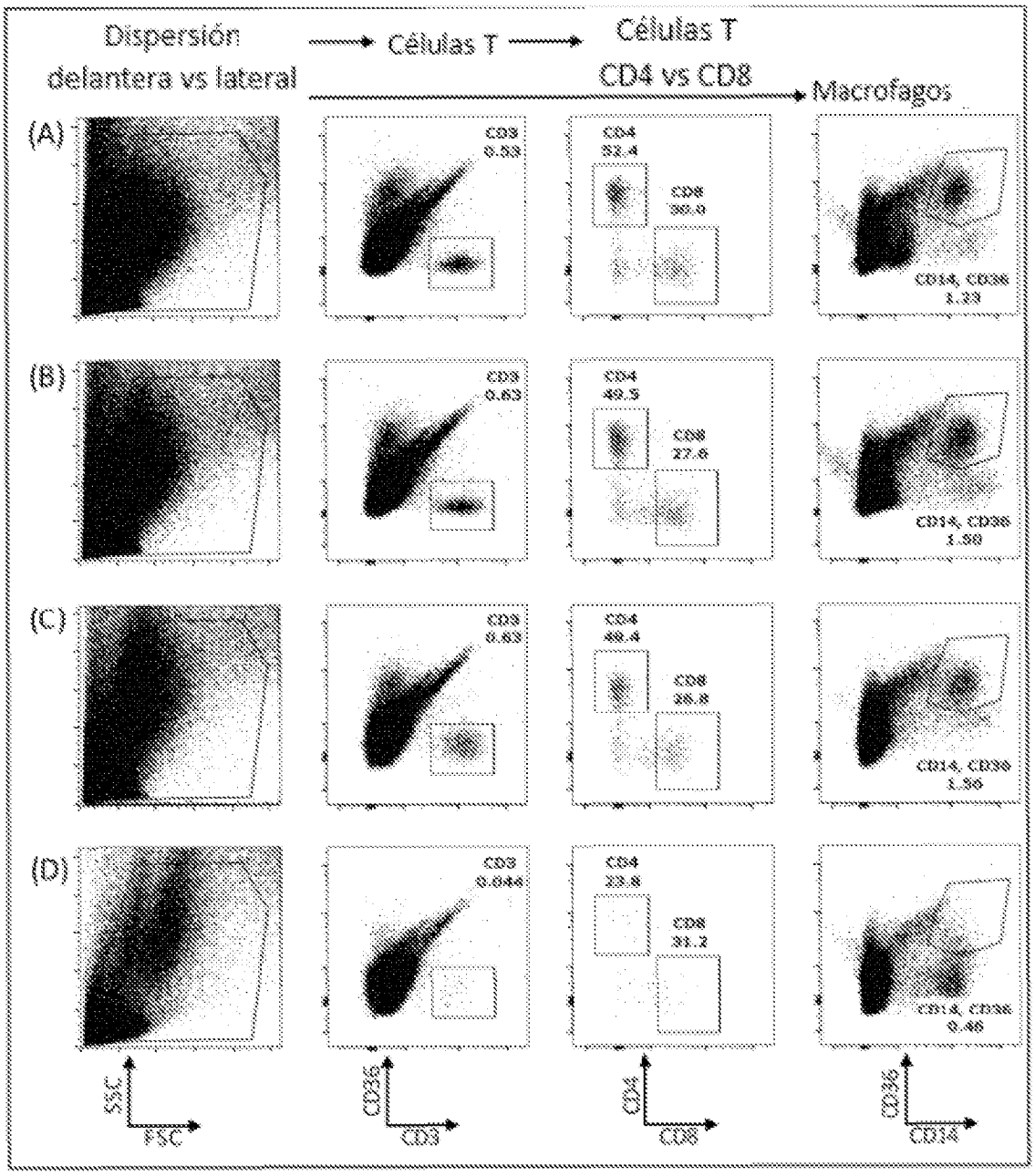

Dispersión delantera vs lateral
Células T
Células T CD4 vs CD8
Macrofagos
(A)
(B)
(C)
(D)
CD3 0.53
CD4 52.4
CD8 30.0
CD14, CD36 1.23
CD3 0.63
CD4 42.5
CD8 27.6
CD14, CD36 1.30
CD3 0.63
CD4 42.4
CD8 28.8
CD14, CD36 1.36
CD3 0.044
CD4 23.8
CD8 31.2
CD14, CD36 0.46
SSC
FSC
CD36
CD3
CD4
CD8
CD36
CD14

Fig. 6

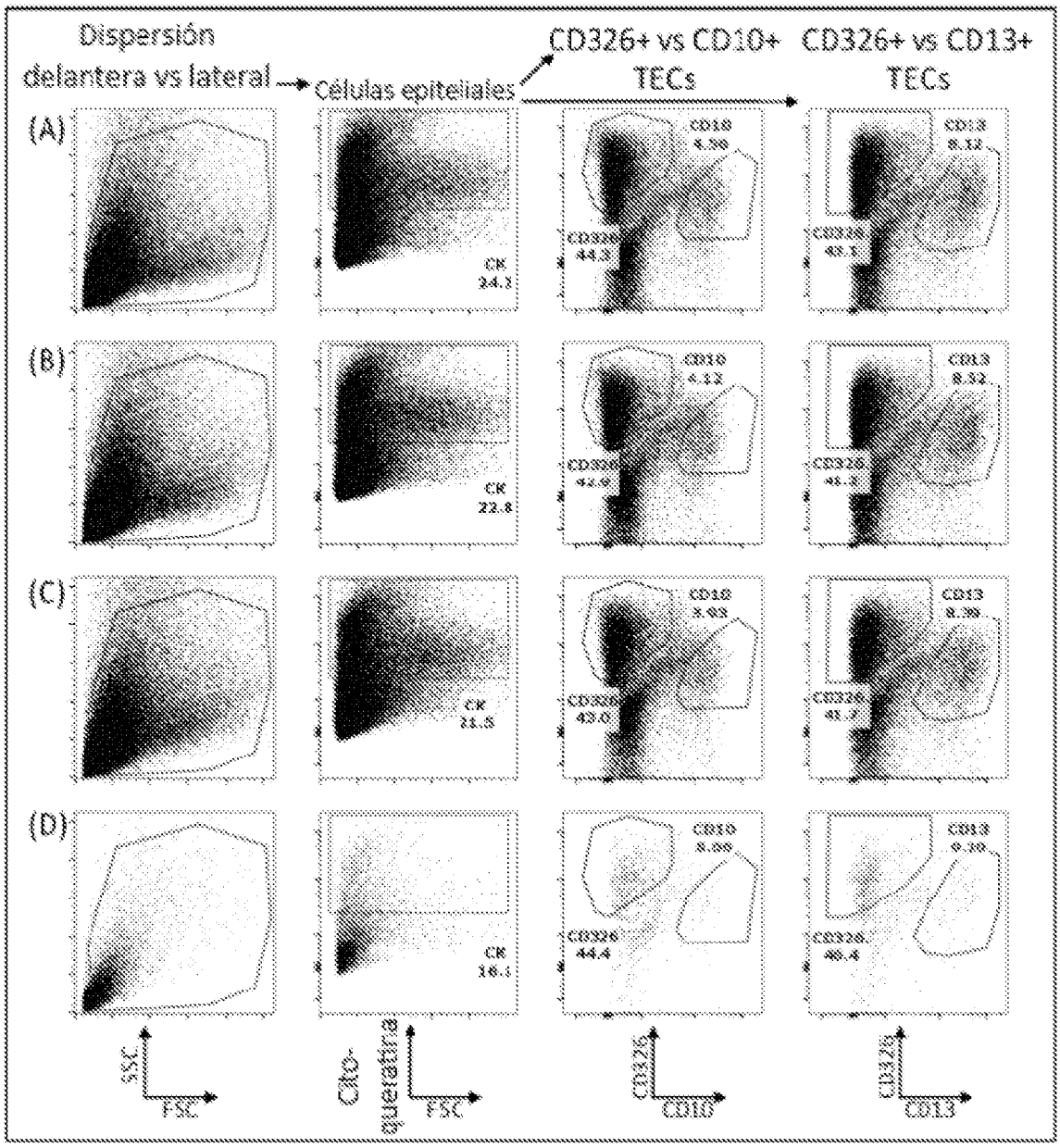

Dispersión delantera vs lateral
Células epiteliales
CD326+ vs CD10+ TECs
CD326+ vs CD13+ TECs
(A)
(B)
(C)
(D)
CK 24.2
CK 22.8
CK 21.5
CK 16.1
CD10 4.56
CD326 44.3
CD13 8.32
CD326 48.5
CD10 4.12
CD326 44.0
CD13 8.32
CD326 48.3
CD10 3.93
CD326 43.0
CD13 8.39
CD326 48.2
CD10 8.09
CD326 44.4
CD13 9.38
CD326 48.4
SSC
FSC
Cito-queratina
FSC
CD326
CD10
CD326
CD13

Fig. 7

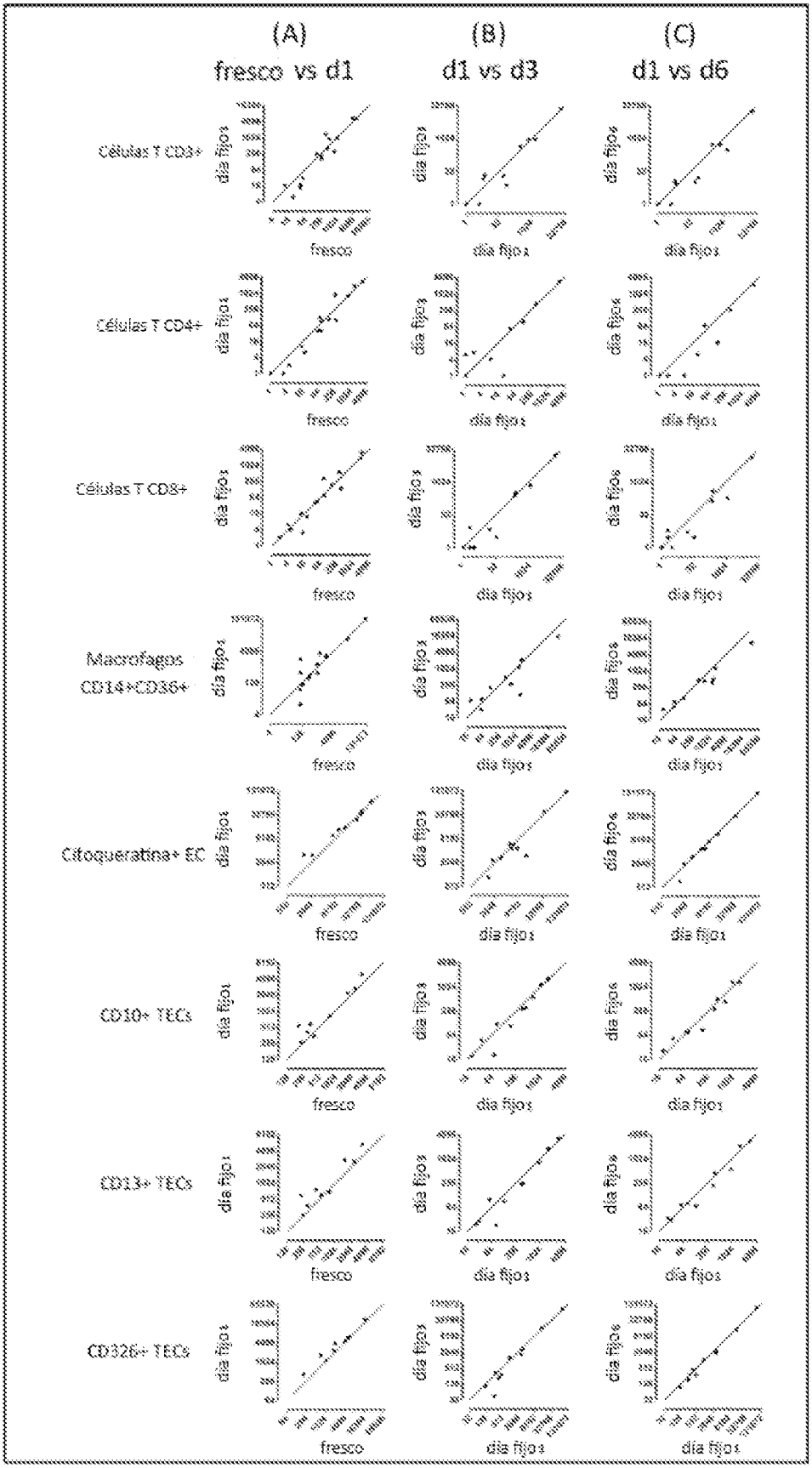

(A)
fresco vs d1
(B)
d1 vs d3
(C)
d1 vs d6
Células T CD3+
Células T CD4+
Células T CD8+
Macrofagos
CD14+CD36+
Citoqueratina+ EC
CD10+ TECs
CD13+ TECs
CD326+ TECs
día fijo1
día fijo3
día fijo6
fresco

Fig. 8a

A.

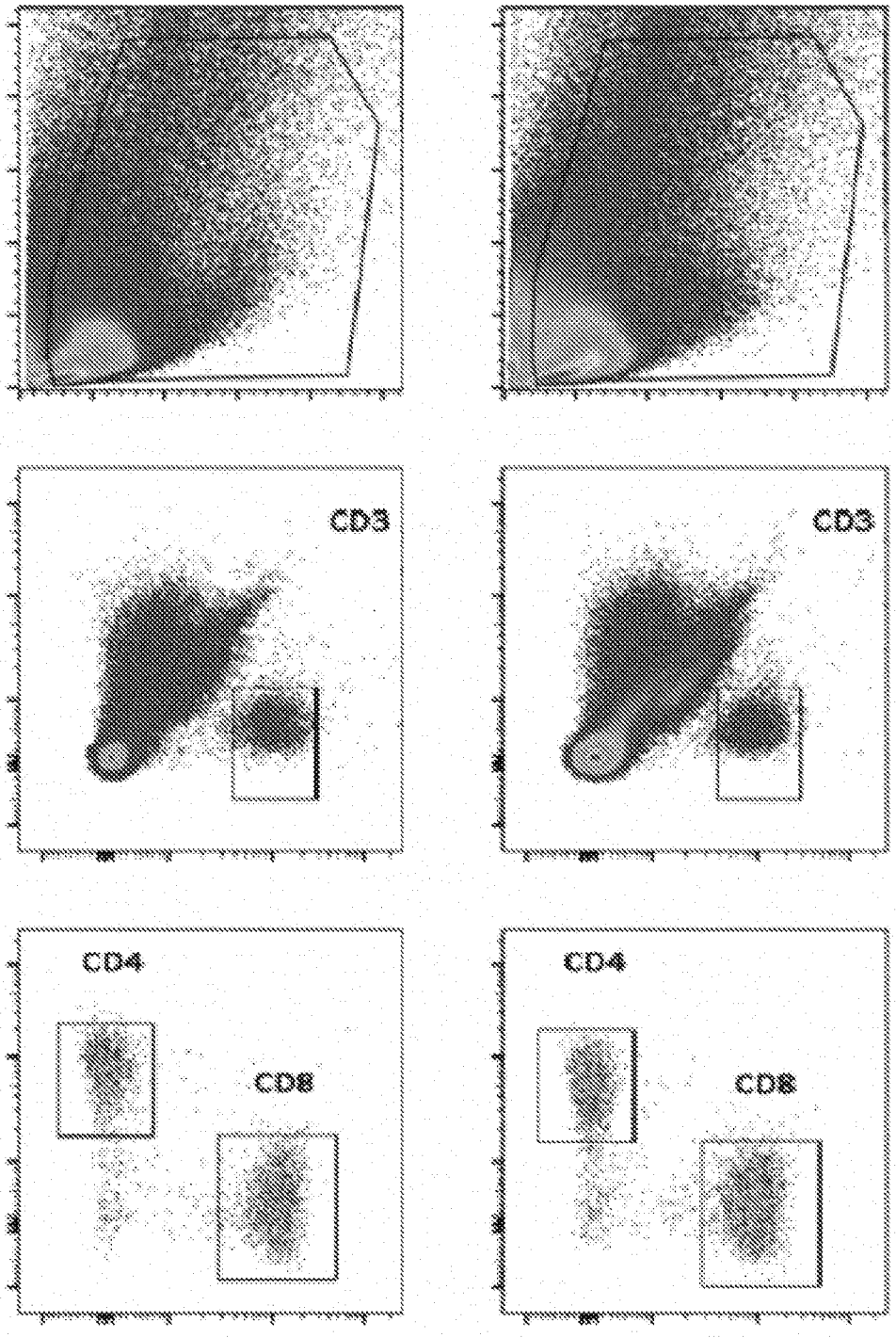


Fig. 8b

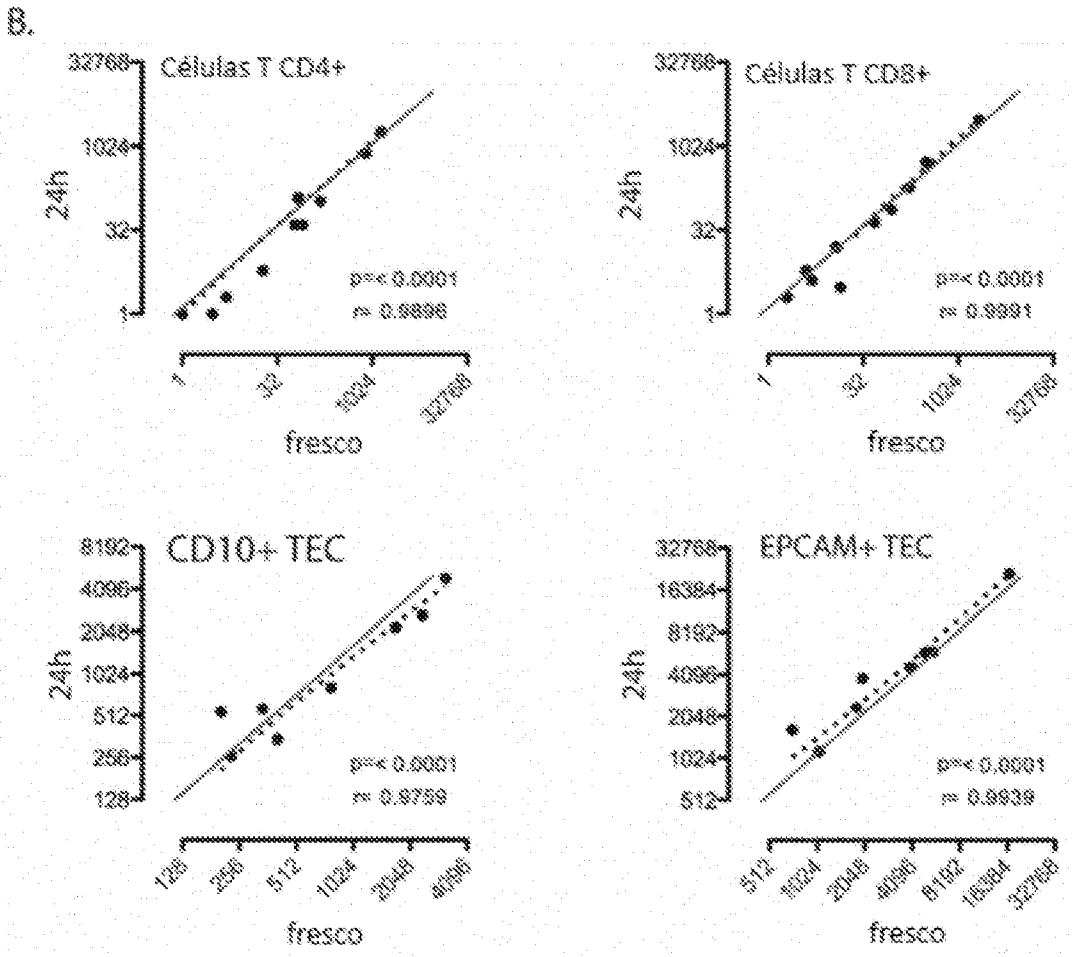
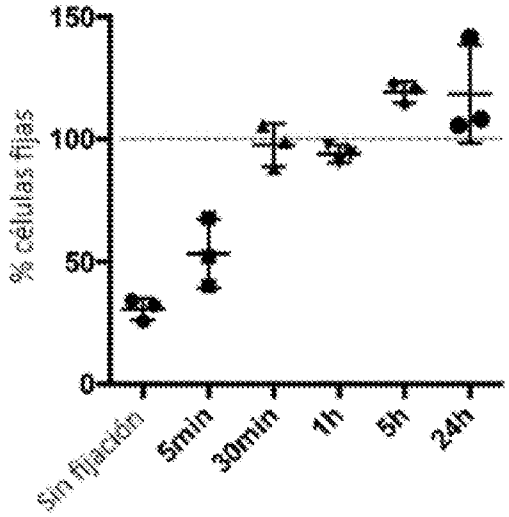

B.
Células T CD4+
Células T CD8+
CD10+ TEC
EPCAM+ TEC
24h
fresco
p=< 0.0001

Fig. 9


% células fijas
Sin fijación
5min
30min
1h
5h
24h

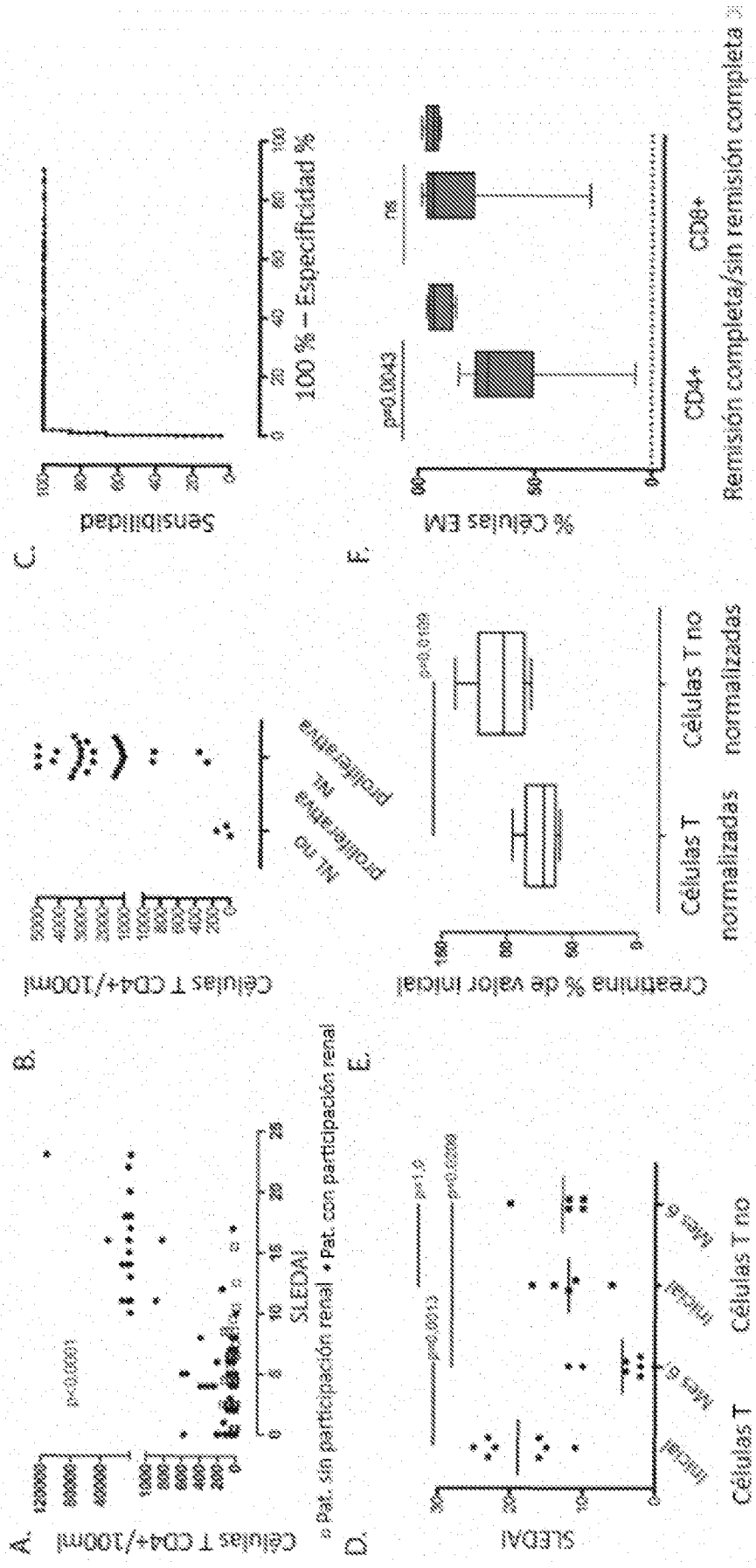
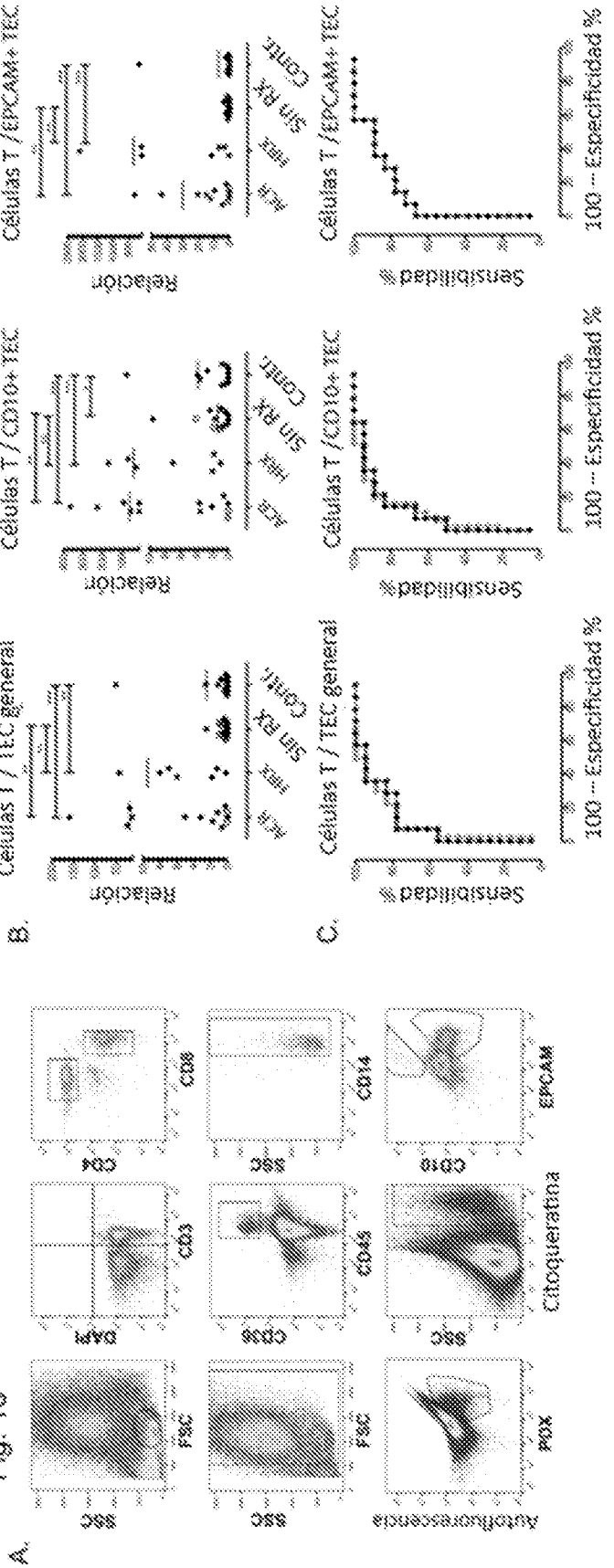

A.
Células T CD4+/100ml
p=0.0001
SLEDAI
Pat. sin participación renal
Pat. con participación renal
B.
Células T CD4+/100ml
No proliferante
Proliferante
C.
Sensibilidad
100 % – Especificidad %
D.
SLEDAI
p=1.6
p=0.0013
p=0.0008
Células T
Células T no normalizadas
E.
Creatinina % de valor inicial
p=0.0106
Células T
Células T no normalizadas
E.
% Células EM
p=0.0043
ns
CD4+
CD8+
Remisión completa/sin remisión completa

Fig. 6

Fig. 10


A.
SSC
FSC
DAPI
CD3
CD4
CD8
CD45
CD14
Autofluorescencia
POX
Citoqueratina
CD19
EPCAM
B.
Células T / TEC general
Células T / CD10+ TEC
Células T /EPCAM+ TEC
Relación
con Rx
sin Rx
Cont.
C.
Sensibilidad %
100 – Especificidad %