



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 167 590**

⑤① Int. Cl.⁷: G01N 33/564

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **96926657.6**

⑧⑥ Fecha de presentación: **06.08.1996**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 843 819**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **27.05.1998**

⑤④ Título: **Método para diagnosticar enfermedades autoinmunes.**

③⑩ Prioridad: **07.08.1995 KR 95/24341**

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
16.05.2002

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
16.05.2002

⑦③ Titular/es: **Think You Kim**
7-1207, Hanyang Apartment, Jayang-Dong
Kwangjin-ku, Seoul 143-190, KR

⑦② Inventor/es: **Kim, Think You**

⑦④ Agente: **Díez de Rivera de Elzaburu, Alfonso**

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).

DESCRIPCION

Método para diagnosticar enfermedades autoinmunes.

Antecedentes del invento

Campo del invento

El presente invento está relacionado con un nuevo método de diagnóstico de enfermedades autoinmunes. Más específicamente, el presente invento está relacionado con un nuevo método para diagnosticar enfermedades autoinmunes mediante detección inmunológica de anticuerpos de centros organizadores de microtúbulos, (referidos de aquí en adelante como "MTOC") y/o microtúbulos que se extienden desde ellos y/o proteínas acompañantes presentes en tejidos o células humanas y animales.

Descripción de las técnicas anteriores

Una enfermedad autoinmune, un trastorno del sistema inmune que causa la formación de anticuerpos contra materiales endógenos y no contra materiales exógenos, puede ser clasificada dentro de dos categorías: enfermedades reumáticas sistémicas y enfermedades autoinmunes organoespecíficas. Las enfermedades reumáticas sistémicas, de nuevo pueden ser clasificadas dentro de muchos tipos de enfermedades incluyendo el lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, o similares.

La artritis reumatoide es una enfermedad de aparición muy frecuente, que se encuentra en 1-5% de la población mundial. Sus síntomas típicos incluyen rigidez matutina y dolor de las articulaciones de las manos y de los pies.

Puesto que la etiología de la artritis reumatoide es aún desconocida, su terapia satisfactoria o su diagnosis precisa no es fácil.

Hasta ahora, se ha detectado el factor reumatoide para diagnosticar la artritis reumatoide. Sin embargo, el factor reumatoide no se detecta en todos los pacientes con la enfermedad, y además, muestra resultados positivos en alrededor de 5-20% de personas normales. (ARA Glossary Committee, Dictionary of the rheumatic disease 11, diagnostic testing, p. 17, 1985).

Para evitar estos problemas, se desarrollaron anticuerpos antiqueratina, anti factor perinuclear y anti-RA-33. Estos anticuerpos contribuyeron a mejorar la especificidad del diagnóstico de la artritis reumatoide. Sin embargo, la sensibilidad es aún baja para usar en la práctica.

En particular, el test ANA ("Antinuclear antibody test", "Test de anticuerpos antinucleares") ha sido el test más ampliamente usado para diagnosticar enfermedades autoinmunes. Sin embargo, el test convencional ANA que emplea la línea celular HEp-2 está principalmente dirigido para detectar lupus eritematoso sistémico. Por lo tanto, es necesario detectar el factor reumatoide separadamente para diagnosticar la artritis reumatoide.

El presente inventor había encontrado que un macrófago es más útil que la línea celular HEp-2 usada convencionalmente para diagnosticar enfermedades autoinmunes, y tuvo éxito en establecer una línea celular de macrófago (véase el documento WO-A-94/02594).

La línea celular establecida fue nombrada "IT-1" y fue depositada en la Korean Culture Collec-

tion of Microorganisms, En la Universidad Yonsei ubicada en Seúl, Corea, bajo el Número de Acceso KFCC 10772 conforme al Tratado de Budapest.

Como resultado de una extensa y continuada investigación, el presente inventor encontró sorprendentemente que los fluidos corporales de pacientes con artritis reumatoide contienen característicamente anticuerpos contra centros organizadores de microtúbulos ("MTOC") y/o microtúbulos ("MT") que se extienden desde ellos.

Resumen del invento

De este modo, un objeto del presente invento es proporcionar un método para diagnosticar enfermedades autoinmunes con elevada especificidad y sensibilidad.

Otro objeto del presente invento es proporcionar un método para diagnosticar enfermedades autoinmunes que comprende las etapas de:

poner en contacto una muestra de fluido corporal de un sujeto sospechoso de tener una enfermedad autoinmune con cualquier tejido vivo o línea celular; y

determinar si los MTOC y/o MT y/o proteínas asociadas con ellos han reaccionado con anticuerpos anti-MTOC-MT, o no, en el fluido corporal.

El presente invento también proporciona un método para detectar anticuerpos antinucleares, anticuerpos anticitoplasmáticos y anticuerpos anti-MTOC-MT simultáneamente, usando un tejido o célula.

El presente invento además proporciona un método para diagnosticar enfermedades autoinmunes que comprende las siguientes etapas:

preparar una placa de vidrio sobre la cual se inmoviliza un tejido o célula;

preparar una muestra de fluido corporal de un sujeto sospechoso de tener una enfermedad autoinmune;

poner en contacto la muestra de fluido corporal con el tejido o célula sobre la placa de vidrio e incubar a cierta temperatura durante un cierto período de tiempo; y

detectar la presencia de anticuerpos anti-MTOC-MT, que responde a los MTOC, MT o proteínas asociadas con ellos en el tejido o célula.

Breve descripción de dibujos

Este invento será descrito con más detalle con referencia a los dibujos que se acompañan, en los cuales:

La FIG. 1 es una imagen de microscopía de fluorescencia que muestra anticuerpos anti-MTOC-MT detectados por una técnica de inmunofluorescencia indirecta usando las células IT-1. El MTOC se localiza cerca del núcleo de las células IT-1, y pueden verse MT de tipo filamentoso que se extienden desde los MTOC.

Los objetos anteriores y otros, características y aplicaciones del presente invento serán evidentes a aquellos expertos en la técnica a partir de la siguiente explicación detallada.

Explicación detallada del invento

El presente invento está basado en los sorprendentes descubrimientos del inventor, de que los fluidos corporales de pacientes con artritis reumatoide contienen característicamente autoanticuerpos contra centros organizadores de microtúbulos ("MTOC"), y/o microtúbulos ("MT") que se extienden desde ellos, y/o proteínas asociadas con MTOC y MT. Los MTOC, MT y proteínas asociadas con ellos se encuentran en todos los tejidos o células originarias de animales incluyendo los seres humanos. Además, se espera firmemente que los MTOC, MT y proteínas acompañantes se encuentren en insectos.

El término "anticuerpos anti-MTOC-MT" empleado a lo largo toda la solicitud quiere decir e incluye todos los anticuerpos para MTOC, MT, proteínas asociadas con MTOC y proteínas asociadas con MT. Esto está basado en el hecho de que los autoanticuerpos en los fluidos corporales de pacientes con enfermedades autoinmunes pueden responder inmunológicamente a uno, dos o todos los MTOC, MT y proteínas asociadas. Aquí, los anticuerpos son autoanticuerpos y están presentes en pacientes con enfermedades autoinmunes, particularmente en fluidos corporales de pacientes con artritis reumatoide.

Para el presente invento, el origen y tipo de tejidos o células que sirven como fuente de MTOC, MT y proteínas acompañantes que reaccionen con anticuerpos anti-MTOC-MT de pacientes con enfermedades autoinmunes no está particularmente limitado. Los MTOC, MT y proteínas acompañantes están presentes en todos los tejidos o células de humanos, animales tales como ratas, ratones, conejos, vacas e insectos. En cuanto al tipo de tejidos o células, para el propósito de un uso simple y fácil, puede ser usado ventajosamente cualquier tejido o célula establecido. Por ejemplo, la línea celular IT-1 (KFCC 10772), una línea celular establecida de macrófagos proporcionada por el presente inventor puede ser usada ventajosamente. O unas células de cáncer humanas tales como HEp-2 (depositadas en la ATCC bajo número de acceso CCL 23 o disponibles comercialmente) pueden ser empleadas ventajosamente. En particular, la línea celular IT-1 puede ser empleada más ventajosamente, puesto que proporciona una detección más precisa y más clara de los MTOC y MT de pacientes con enfermedades autoinmunes.

Además, para aplicaciones más convenientes, los tejidos o células pueden ser inmovilizados sobre una placa de vidrio. La inmovilización de tejidos humanos o células sobre la placa de vidrio puede llevarse a cabo usando métodos convencionales. Los parámetros tales como tiempo, temperatura y fijadores pueden ser elegidos sin dificultad por aquellos expertos en la técnica y no limitan el presente invento. Pueden emplearse ventajosamente como fijadores, disolventes orgánicos tales como etanol, acetona o metanol y reactivos reticuladores tales como paraformaldehído o glutaraldehído, individualmente o como mezclas de éstos.

Cuando los tejidos o células estén inmovilizados sobre la placa de vidrio, los tejidos o células pueden ser tratados para quitarles su pared celu-

lar con objeto de obtener una lectura fácil y clara de los resultados. Para este propósito, se pueden emplear agentes tensioactivos tales como Triton XTM.

Los resultados de reacciones inmunológicas entre MTOC, MT y/o proteínas acompañantes en tejidos o células y anticuerpos anti-MTOC-MT en pacientes pueden ser detectados usando cualquier técnica convencional empleada para detectar reacciones inmunológicas. Pueden emplearse, por ejemplo, técnicas de inmunofluorescencia indirecta, técnicas de inmunoenzimas y radioinmunoensayos.

Hasta ahora, como se ha descrito antes, tenían que ser realizados dos o más tests separados, por ejemplo, el test ANA (anticuerpos antinucleares) más el factor reumatoide para obtener un resultado fiable para la diagnosis de una enfermedad autoinmune. En contraste, el presente invento permite el uso de líneas celulares establecidas tales como la de macrófagos humanos IT-1 o células de cáncer humanas HEp-2 para ser usadas como tejidos o células humanas para detectar no sólo anticuerpos anti-MTOC-MT, sino también anticuerpos antinucleares simultáneamente, haciendo de ese modo posible detectar un espectro más amplio de enfermedades autoinmunes incluyendo la artritis reumatoide.

El fluido corporal de pacientes con enfermedades autoinmunes puede incluir, pero no se limitado a, muestras de sangre tales como sangre total, suero, o plasma, fluidos sinoviales, fluidos cerebrospinales, o fluidos pleurales.

El método para diagnosticar la artritis reumatoide usando tejidos o líneas celulares será descrito en más detalle a continuación.

Se prepara una placa de vidrio que tiene sobre ella un tejido o línea celular inmovilizado. Se deposita gota a gota sobre la placa de vidrio una serie de dos diluciones (30 microlitros cada una) (diluciones desde 1:20 hasta 1:1280) de fluido corporal de un paciente con artritis reumatoide. Tras dejar que reaccionen a temperatura ambiente y alta humedad durante alrededor de 30 minutos, la placa de vidrio se coloca dentro de un recipiente de Copran que contiene tampón fosfato salino (PBS), se agita a 200 rpm usando un agitador, se lava y se seca. Se deposita gota a gota treinta microlitros de una dilución (1:40) de inmunoglobulina polivalente antihumano conjugada con fluoresceína (Dako) sobre la placa, que se deja luego reaccionar a temperatura ambiente y alta humedad durante alrededor de 30 minutos. Tras lavar la placa con PBS, la placa se tiñe negativamente usando 0,2% de azul de Evans (Sigma) y se lava con PBS.

El exceso de tampón se elimina usando un papel absorbente, se deposita una solución de PBS-glicerol, y se observa bajo un microscopio de fluorescencia.

Se observan patrones fluorescentes circulares o en forma de anillo de MTOC cerca del núcleo. Se observan también microtúbulos filamentosos que se extienden desde los MTOC (FIG 1). Tales patrones son características morfológicas de los MTOC y MT, respectivamente (Molecular Biology of the Cell, 3^a Ed., Garland, pp 789-795).

Los anticuerpos detectados en el fluido cor-

poral de pacientes con una enfermedad autoinmune, particularmente artritis reumatoide, se supone que son anticuerpos contra MTOC, MT y proteínas asociadas a ellos. El presente inventor denominó al patrón fluorescente en la FIG. 1 como "patrón perinuclear único de grandes gránulos con esqueleto", que es una característica de la artritis reumatoide.

Realizaciones preferidas del invento

El presente invento será caracterizado por medio de los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos sólo se proporcionan con propósito ilustrativo y no deben ser interpretados como una limitación del alcance del invento, el cual está correctamente delineado en las reivindicaciones que lo acompañan. Las partes o porcentajes en los Ejemplos están basados en el peso, salvo que se indique de otra manera.

Ejemplo 1

Se colocaron 2×10^4 células/ml de la línea celular IT-1 (KFCC 10772), cultivadas en RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino, en pocillos de placas de vidrio. Las células se hicieron crecer en un incubador bajo una atmósfera de 5% CO₂, a 37°C durante 24 horas. El medio de cultivo se retiró de las placas, y se lavaron las placas con PBS y se sumergieron en una mezcla acetona-metanol (1:1) durante 5 minutos para su fijación.

Muestras de suero de 269 pacientes con artritis reumatoide, que fueron almacenadas a -70°C, fueron diluidas dos veces sucesivamente desde 1:20 a 1:1280.

Se depositaron gota a gota treinta microlitros de cada dilución sobre las placas y se dejó que reaccionaran a temperatura ambiente y alta humedad durante 30 minutos.

Las placas de vidrio se colocaron en un recipiente de Copran que contenía PBS, y se agitaron a 200 rpm usando un agitador, se lavaron y se secaron. Se depositaron gota a gota treinta microlitros de una dilución (1:40) de inmunoglobulina polivalente antihumana conjugada con fluoresceína (Dako) sobre las placas, lo cual se dejó entonces reaccionar a temperatura ambiente y alta humedad durante alrededor de 30 minutos. Tras lavar las placas con PBS, las placas fueron teñidas negativamente usando 0,2% de azul de Evans (Sigma) y lavadas con PBS. El exceso de PBS se eliminó usando un papel absorbente, se depositó una solución de PBS-glicerol, y se observó bajo un microscopio de fluorescencia.

El resultado se muestra en la FIG. 1. Se observaron patrones fluorescentes circulares o en forma de anillos de los MTOC cerca del núcleo. También se observaron MT filamentosos que se extienden desde los MTOC. Es decir, se observó el patrón "perinuclear único de grandes gránulos con esqueleto".

Ejemplo Comparativo 1

Diagnosis de artritis reumatoide a través del test de factor reumatoide

Se depositaron gota a gota 0,05 ml de muestras de suero, que eran las mismas que las usadas en el Ejemplo 1, sobre una placa de vidrio, y se les añadió la misma cantidad de una emulsión de gammaglobulina humana (Iatron). Se mezcló

bien la mezcla y se dejó reposar durante 1 minuto. Después, la placa de cristal fue agitada suavemente en dirección horizontal y se observó cualquier agregación.

Resultados

148 (55%) de 269 muestras mostraron reacciones positivas en el test del invento (Ejemplo 1) y en el test del factor reumatoide (Ejemplo Comparativo 1). 62 (23%) de las muestras fueron negativas en el test del factor reumatoide y positivas en el test del invento, mientras que 42 (16%) muestras fueron positivas en el test del factor reumatoide y negativas en el test del invento. Y 17 muestras (6%) fueron negativas en ambos tests.

Estos resultados indican que el método del invento es altamente sensible comparado con el test convencional del factor reumatoide, reduciendo significativamente de este modo la probabilidad de falsos resultados negativos.

Ejemplo 2

Los procedimientos del Ejemplo 1 y del Ejemplo Comparativo 1 se llevaron a cabo usando muestras de sangre de 125 seres humanos normales.

A diluciones 1:20, el test del invento dio 4% (5 de 125) resultados positivos, mientras que el test del factor reumatoide dio 9,6% (12 de 125) resultados positivos. Consecuentemente, puede probarse que el método del invento usando anticuerpos anti-MTOC-MT reduce la probabilidad de falsos resultados positivos. Por lo tanto, el método del invento puede incrementar la especificidad.

Ejemplo 3

Se prepararon muestras de sangre de doce pacientes que mostraban resultados positivos en ambos tests, el del invento y el del factor reumatoide. El procedimiento del Ejemplo 1 fue llevado a cabo usando las mismas muestras de sangre sobre células HEp-2 disponibles comercialmente, adquiridas de Kallestad (USA) o MBL (Japón) en vez de las células IT-1.

Ambos experimentos dieron resultados positivos de anticuerpos anti-MTOC-MT. Sin embargo, las células HEp-2 de las dos compañías mostraron una fluorescencia más débil que la línea celular IT-1 del Ejemplo 1. Además, los tests que utilizaron células HEp-2 sólo mostraron MTOCs de muy pequeño tamaño.

Ejemplo 4

El procedimiento del Ejemplo 1 se llevó a cabo con la excepción que la línea celular IT-1 fue fijada con una mezcla de 4% paraformaldehído/0,2% Triton-X, o tratada con 0,5% de Tritón-X, respectivamente. Los resultados mostraron patrones fluorescentes más claros cuando se trataron con 0,5% de Triton-X.

Ejemplo 5

Pacientes con artritis reumatoide normalmente experimentan edema articular y un aumento de fluido sinovial. Así, se puede usar fluido sinovial para detectar anticuerpos anti-MTOC-MT.

El procedimiento del Ejemplo 1 se llevó a cabo con la excepción que se usó el fluido sinovial de diez pacientes con artritis reumatoide. Como resultado, todas las muestras sinoviales mostraron

resultados positivos.

Ejemplo 6

El procedimiento del Ejemplo 1 se llevó a cabo con la excepción que se usaron células McCoy (ATCC CRL 1696) y una línea celular de macrófagos de origen de ratón (células RAW, ATCC TIB 71) en vez de las células IT-1. Estas

células se usaron para preparar las placas de vidrio sobre las que se aplicaron sueros de doce pacientes que se sabía que eran positivos anti-MTOC-MT. Estas líneas celulares de ratón mostraron MTOC que eran mucho más pequeños comparados con aquellos vistos en las células IT-1, pero los MT mostraron resultados positivos.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método "in vitro" para diagnosticar una enfermedad autoinmune, que comprende una etapa de detectar inmunológicamente autoanticuerpos en fluidos corporales de un sujeto sospechoso de tener una enfermedad autoinmune, siendo dichos autoanticuerpos ("anticuerpos anti-MTOC-MT") anticuerpos contra los centros organizadores de microtúbulos ("MTOC"), microtúbulos ("MT") que se extienden desde los MTOC, o proteínas asociadas con ellos.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad autoinmune es artritis reumatoide.

3. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de detectar inmunológicamente autoanticuerpos es llevada a cabo poniendo en contacto los fluidos corporales con tejidos o células.

4. El método de la reivindicación 3, en el que dichos tejidos o células son originarios de seres humanos, animales, o insectos.

5. El método de la reivindicación 4, en el que dichos tejidos o células son cultivados o establecidos.

6. El método de la reivindicación 5, en el que dichas células son HEp-2, macrófagos, líneas celulares de macrófago o células McCoy.

7. El método de la reivindicación 6, en el que dicha línea celular de macrófago es la línea celular IT-1, depositada bajo el número de acceso KFCC 10772.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que los tejidos o células humanas son adheridos a una placa de vidrio, o cultivados y luego inmovilizados sobre una placa de vidrio.

9. El método de la reivindicación 8, en el que dicha adherencia o fijación se lleva a cabo usando disolventes orgánicos o agentes reticuladores.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que los tejidos o células son tratados con un agente tensioactivo.

11. El método de la reivindicación 1, en el que la detección inmunológica se lleva a cabo por la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, que comprende una detección de anticuerpos anti-MTOC-MT, así como anticuerpos antinucleares y anticitoplasmáticos.

13. El método de la reivindicación 11, en el que la técnica de inmunofluorescencia indirecta da un patrón de fluorescencia perinuclear único de grandes gránulos con esqueleto.

14. El método de la reivindicación 1, en el que los fluidos corporales son sangre o fluido sinovial.

30

35

40

45

50

55

60

65

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

FIG. 1

