

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 905**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2006 E 06715833 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 1848997**

54 Título: **Composición para la prevención, tratamiento y diagnóstico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)**

30 Prioridad:

**05.02.2005 KR 20050010924**  
**02.02.2006 KR 20060010285**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.05.2013**

73 Titular/es:

**JEON, SOOK-YEONG (50.0%)**  
**217-1702 SSANGYONG APARTMENT, 831**  
**SANGHYEON-RI, SUJI-EUP**  
**YONGIN-SI, GYEONGGI-DO 449-843, KR y**  
**NAHM, DONG-HO (50.0%)**

72 Inventor/es:

**JEON, SOOK-YEONG y**  
**NAHM, DONG-HO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 403 905 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

Composición para la prevención, tratamiento y diagnóstico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

### Antecedentes de la invención

#### Campo de la técnica

- 5 La presente invención se refiere a composiciones para la prevención, tratamiento y diagnóstico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

#### Técnica anterior

10 Actualmente, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se define como una enfermedad crónica que muestra obstrucción irreversible de las vías respiratorias a causa de la progresión de dos enfermedades subyacentes principales, incluidas bronquitis crónica y enfisema pulmonar. La bronquitis crónica se define clínicamente como la persistencia de tos, esputo y dificultades respiratorias, un enfisema pulmonar se define histopatológicamente como la destrucción irreversible de las paredes de las vías respiratorias distales a los bronquiolos terminales y clínicamente muestra dificultades respiratorias lentamente progresivas (resumen del taller GOLD, Am J Respir Crit Care Med 2001; 163:1256-1276). Por tanto, la definición actual de EPOC excluye un asma bronquial que muestra obstrucción reversible de las vías respiratorias. Actualmente, la EPOC es la cuarta causa principal de muerte en Estados Unidos y Europa y causas de muerte en pacientes con EPOC son las complicaciones de la enfermedad, como insuficiencia respiratoria o infección (resumen del taller GOLD, Am J Respir Crit Care Med 2001; 163:1256-1276).

20 En la actualidad, el tabaquismo se considera como el factor de riesgo más importante para el desarrollo de EPOC. Y las secreciones de muchos mediadores inflamatorios (IL-8 etc.) de las células epiteliales de las vías respiratorias estimuladas por el tabaquismo y otros factores, incluida la contaminación del aire o la infección crónica por bacterias o virus se consideran responsables del desarrollo de inflamación crónica del tejido de las vías respiratorias en la EPOC (resumen del taller GOLD, Am J Respir Crit Care Med 2001; 163:1256-1276). No obstante, el motivo de la persistencia crónica de inflamación tras inflamación aguda inducida por dichos estímulos externos todavía no se ha determinado. En consecuencia, se ha sugerido que otros mecanismos patogénicos además del tabaquismo pueden estar implicados en el mecanismo patogénico de la EPOC (O'Byrne PM, Postma DS. Am J Respir Crit Care Med 1999; 159: S41-S66). Especialmente, las razones de la persistencia de la inflamación de las vías respiratorias y la apoptosis de las células epiteliales de las vías respiratorias en pacientes con EPOC incluso después de dejar de fumar todavía no se han explicado (Hodge S y col., Eur Respir J 2005;25:447-54). La etiología y el mecanismo patogénico de la EPOC todavía no se han determinado y, por tanto, ahora el tratamiento fundamental de la EPOC es difícil. Los pacientes de EPOC que tienen enfermedad avanzada y una disminución grave de la función pulmonar tienen un riesgo elevado de muerte prematura asociada con la enfermedad (resumen del taller GOLD, Am J Respir Crit Care Med 2001; 163: 1256-1276).

35 Actualmente, el diagnóstico de la enfermedad pulmonar obstructiva se puede establecer cuando los pacientes se quejen de síntomas clínicos típicos (tos, esputo y disnea etc.) y su FEV1 medido tras la inhalación de un broncodilatador muestra menos del 80 % del valor previsto y la proporción de FEV1/FVC sea inferior a 70 % en la prueba de la función pulmonar (resumen del taller GOLD, Am J Respir Crit Care Med 2001; 163:1256-1276). No obstante, sigue sin haber una prueba de laboratorio que se pueda usar para la detección precoz de pacientes con EPOC con quejas de síntomas clínicos típicos pero que muestran una función pulmonar normal y, por tanto, que se pueda usar para la prevención de la progresión adicional de la EPOC.

45 Como terapia farmacológica de la EPOC, se sabe que los broncodilatadores y los corticosteroides son eficaces para la mejora de los síntomas clínicos. La administración directa de corticosteroides en el tejido de las vías respiratorias diana mediante dispositivos de inhalación es el método preferido sobre la administración sistémica para evitar efectos secundarios sistémicos. Otros medicamentos, tales como la teofilina, también pueden ser útiles. No obstante, sigue sin haber un agente terapéutico disponible que pueda inducir una remisión completa de la EPOC o fundamentalmente mejorar la EPOC y modificar una evolución natural de la enfermedad.

50 Se ha comunicado la detección de autoanticuerpos frente a antígenos de tejidos de las vías respiratorias o pulmonares en pacientes con EPOC (Wagner V, y col., Acta Allergol 1965;20:1-9). Aunque se ha propuesto una hipótesis de que la EPOC se debe a un mecanismo autoinmunitario (Agusti A, y col., Thorax 2003;58:832-834), esta hipótesis no se ha demostrado claramente porque todavía no se ha identificado un autoantígeno que reaccione con autoanticuerpos en la sangre de pacientes con EPOC. Recientemente se ha demostrado que el enfisema pulmonar (una de las enfermedades subyacentes principales causantes de EPOC) podría haberse desarrollado en animales mediante respuesta autoinmunitaria contra el autoantígeno endotelial vascular (Taraseviciene-Stewart L, y col., Am J Respir Crit Care Med. 2005;171:734-42). En el estudio anterior se ha comunicado que ratas inmunizadas con antígenos extraídos de células endoteliales vasculares humanas para inducir respuesta autoinmunitaria desarrollaron enfisema pulmonar y que la transferencia pasiva de células CD4+ desde los bazo de las ratas anteriores con enfisema pulmonar a ratas no tratadas previamente tuvo como resultado enfisema pulmonar en ratas receptoras y el enfisema pulmonar también se ha producido en ratones tras la inyección de anticuerpos anti-células

5 endoteliales obtenidas de suero de ratas inmunizadas con células endoteliales vasculares (Taraseviciene-Stewart L, y col., Am J Respir Crit Care Med. 2005;171:734-42). En este estudio se mostró que los anticuerpos contra antígenos de células endoteliales vasculares bastaban para desencadenar el desarrollo de enfisema pulmonar, aunque todavía no se habían identificado los autoantígenos diana implicados en el desarrollo de la enfermedad. En base a lo anterior, se ha sugerido que el mecanismo autoinmunitario podría estar implicado en la patogénesis de la EPOC.

### **Divulgación**

#### **Problema de la técnica**

10 No obstante, en estudios anteriores no se ha podido establecer una relación causal entre la autoinmunidad y la EPOC debido a la falta de un autoantígeno identificado asociado con pacientes con EPOC y la falta de una asociación lógica entre los autoanticuerpos en el fluido corporal de pacientes con EPOC y los daños en el tejido de las vías respiratorias. Por tanto, actualmente no se usan las pruebas de autoanticuerpos para el diagnóstico o clasificación de la EPOC.

15 Dado que la etiología y el mecanismo primarios causantes del desarrollo de EPOC todavía no se entienden, todavía no se ha desarrollado un método de tratamiento que pueda inducir remisión completa de EPOC. La actual terapia farmacológica para la EPOC puede mejorar los síntomas clínicos y la función pulmonar únicamente durante la administración continua de medicación, pero no hay un método de tratamiento que pueda modificar la evolución natural a largo plazo de la EPOC o prevenir la muerte por EPOC.

20 Una proteína citoqueratina 18, que se identifica como un autoantígeno diana de la EPOC, es una proteína del citoesqueleto encontrada principalmente en las células epiteliales que revisten los tractos respiratorio y gastrointestinal, incluidas las células epiteliales bronquiales y las células epiteliales pulmonares (alveolares) (Moll, R. y col., Cell 1982; 31:11-24). Aunque la citoqueratina 18 es una proteína predominantemente intracelular, su fuerte expresión sobre la superficie celular también se observó en células epiteliales (Moll, R. y col., Cell 1982; 31:11-24; Saarloos, M.N. y col., Curr Eye Res 1999; 19:439-449).

25 El documento WO 03/098211 se refiere a la detección de autoanticuerpos frente a la proteína citoqueratina 18 en pacientes con asma bronquial y rinitis crónica, y sus aplicaciones que incluyen un kit para el diagnóstico del asma bronquial y la rinitis crónica que comprende la proteína citoqueratina 18 de mamíferos. El documento WO 2006/073254 se refiere a la composición para prevención, tratamiento y diagnóstico de enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias y es un documento EPC del artículo 54(3) con respecto a la presente invención. El documento WO 03/023002 se refiere a nuevas proteínas humanas, polinucleótidos que los codifican y procedimientos que usan los mismos. Ryu y Scanlon (es decir, Mayo Clin. Proc. 2001: 76: 1144-1153) se refiere a enfermedades pulmonares obstructivas: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma y muchos imitadores. Jeffery (es decir, Proc Am Thorac Soc vol 1. pág. 176-183, 2004) se refiere a remodelado e inflamación de los bronquios en asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

#### **Solución técnica**

35 Los presentes inventores juzgaron que las proteínas autoantígenos implicadas en el desarrollo de la EPOC podrían estar presentes en las células epiteliales de las vías respiratorias en base a los informes y resultados previos de razonamientos deductivos de los presentes inventores y, por tanto, analizaron las proteínas autoantígenos epiteliales de las vías respiratorias que reaccionan con los autoanticuerpos de IgG mediante el procedimiento de inmunotransferencia usando proteínas procedentes de células epiteliales cultivadas de las vías respiratorias humanas.

40 En consecuencia, los inventores han descubierto autoanticuerpos frente a las células epiteliales de las vías respiratorias en muestras de suero de pacientes con EPOC e identificaron que el autoantígeno epitelial de las vías respiratorias era la proteína citoqueratina 18. Asimismo, los inventores demostraron inhibiciones significativas de citotoxicidad inducida por autoanticuerpos de las células epiteliales de las vías respiratorias mediante adsorción de autoanticuerpos de pacientes con EPOC con proteína citoqueratina 18 y, de este modo, los inventores realizaron la presente invención.

45 Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica para prevenir o tratar la EPOC, que comprende la proteína citoqueratina 18 como principio activo, en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.

50 La presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar la EPOC, que comprende la proteína citoqueratina 18 como principio activo, en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.

La proteína citoqueratina 18 usada en la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.

55 La secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1 es una secuencia de aminoácidos de proteína citoqueratina 18 humana (Homo sapiens) (n° de acceso NCBI P05783) y una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 es una

secuencia de aminoácidos de la proteína citoqueratina 18 bovina (*Bos taurus*) (nº de acceso NCBI XP\_582930).

La proteína citoqueratina 18 se puede producir mediante tecnología de ingeniería genética recombinante usando una de la secuencia de bases de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 2, de modo que se aíslan de células o tejidos de mamíferos o microorganismos y las purifican.

- 5 La “enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)” en la presente invención incluye enfisema pulmonar y bronquitis crónica.

La presente invención se basa en el hecho de identificar la proteína citoqueratina 18 como una unión de autoantígenos epiteliales de las vías respiratorias con autoanticuerpos IgG en las muestras de sangre de pacientes con EPOC por primera vez.

- 10 A partir de informes y resultados anteriores de los ejemplos de la presente invención se puede juzgar que los autoanticuerpos en la sangre de pacientes con EPOC pueden inducir directamente citotoxicidad frente a las células epiteliales de las vías respiratorias a través de la unión a las proteínas citoqueratina 18 de las células epiteliales de las vías respiratorias o inducen indirectamente citotoxicidad frente a las células epiteliales de las vías respiratorias e inducen inflamación crónica del tejido de las vías respiratorias a través de la formación de complejos inmunitarios que consisten en autoanticuerpos y autoantígenos y la activación secundaria del complemento y la quimiotaxis de las células inflamatorias. Y estos daños de las células epiteliales de las vías respiratorias y la inflamación crónica del tejido de las vías respiratorias pueden producir síntomas clínicos de EPOC a través de los desarrollos de cambios estructurales irreversibles de los tejidos de las vías respiratorias.

- 20 En los Ejemplos de la presente invención, los anticuerpos IgG purificados de muestras de sangre de pacientes con EPOC indujeron citotoxicidad en las células epiteliales de las vías respiratorias. Asimismo, la administración de proteína citoqueratina 18 de la presente invención en el modelo de citotoxicidad de células epiteliales de las vías respiratorias inducida por anticuerpos IgG indujo adsorciones de autoanticuerpos en la sangre de pacientes con EPOC y, de este modo, inhibió la citotoxicidad inducida por anticuerpos IgG de las células epiteliales de las vías respiratorias.

- 25 Por tanto, la composición farmacéutica que comprende la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 2 de la presente invención se puede usar como medicamento para prevenir, aliviar o tratar la EPOC.

- 30 La composición farmacéutica que comprende la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 2 como principio activo puede comprender además aditivos farmacéuticos y fisiológicamente aceptables además del principio activo. Dichos aditivos pueden incluir, por ejemplo, excipientes, agentes disgregantes, agentes edulcorantes, agentes aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes de inflado, lubricantes, deslizantes, agentes aromatizantes, solubilizantes etc.

- 35 La composición farmacéutica que comprende la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 2 como principio activo puede comprender además uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables a formular adecuadamente para su administración.

- 40 Para la formulación líquida, los vehículos farmacéuticamente aceptables deberán esterilizarse y ser adecuados para los cuerpos vivos. Por ejemplo, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir solución salina, agua esterilizada, solución de Ringer, solución salina tamponada, solución para inyección de albúmina, solución de dextrosa, solución de maltodextrina, glicerina, etanol o la mezcla de uno o más de los ingredientes anteriores. En caso necesario se pueden añadir otros aditivos habituales, tales como antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos etc. Asimismo, también se pueden añadir agentes de dilución, agentes de dispersión, tensioactivos, aglutinantes o lubricantes con el fin de formular la composición en formulaciones para inyección tales como solución acuosa, suspensión, emulsión, píldoras, cápsulas, gránulos, comprimidos etc. Además, la presente composición farmacéutica se puede formular adecuadamente en función de cada enfermedad o ingrediente de la composición usando el procedimiento divulgado en Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA, como procedimiento preferible en la técnica.

- 45 El tipo de formulación de la presente composición farmacéutica que comprende proteína citoqueratina 18 como principio activo puede ser gránulos, polvo, comprimidos recubiertos, comprimidos, cápsulas, supositorios, jarabe, zumo, suspensiones, emulsiones, gotas, formulación líquida para inyectables o formulación de liberación lenta del compuesto activo etc.

- 50 La presente composición farmacéutica que comprende proteína citoqueratina 18 como principio activo se puede administrar por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal, percutánea, intranasal, rectal, oral, intraocular, intradérmica, localmente o mediante inhalación, de acuerdo con procedimientos habituales.

- 55 La dosis de la presente composición farmacéutica que comprende la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 2 como principio activo significa una cantidad eficaz para inhibir o tratar los daños o la reacción inflamatoria de las células epiteliales y tejidos de las vías respiratorias. Por tanto, esta dosis se puede modificar en función de varios factores, tales como el tipo de

- enfermedad que se va a tratar, la gravedad de la enfermedad, los tipos y cantidades de principios activos y otros ingredientes contenidos en la composición, la edad, el peso, el estado de salud general y el sexo del paciente, la dieta, el momento y la vía de administración, la velocidad de secreción de la composición, el periodo de los fármacos de tratamiento usados de forma simultánea etc. En adultos, cuando la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 se administra una o varias veces al día, la dosis preferible de dicha proteína citoqueratina 18 es 0,01 mg/kg – 100 mg/kg.
- Asimismo, la presente invención proporciona un procedimiento para prevenir o tratar la EPOC administrando proteína citoqueratina 18 en el que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.. Preferentemente, la EPOC anterior puede ser enfisema pulmonar o bronquitis crónica.
- La presente memoria muestra que la administración de proteínas citoqueratina 18 puede absorber autoanticuerpos en la sangre de pacientes con ECPO, inhibiendo de este modo la citotoxicidad inducida por autoanticuerpos a las células epiteliales de las vías respiratorias e inhibiendo el desarrollo de inflamación secundaria del tejido de las vías respiratorias.
- La presente invención proporciona un procedimiento de prevenir o tratar la EPOC administrando proteína citoqueratina 18. En este procedimiento, la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 se puede administrar por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal, percutánea, intranasal, rectal, oral, intraocular, intradérmica, localmente o mediante inhalación, de acuerdo con procedimientos habituales.
- En el procedimiento de prevenir o tratar la EPOC administrando proteína citoqueratina 18 en el que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2, se puede hacer referencia a la dosis de dicha proteína citoqueratina 18 que se va a administrar como una cantidad eficaz para inhibir o tratar la citotoxicidad inducida por autoanticuerpos a células epiteliales de las vías respiratorias o reacción inflamatoria secundaria de los tejidos de las vías respiratorias mediante la formación del complejo inmunitario compuesto por autoantígenos-autoanticuerpos. En adultos, cuando dicha proteína citoqueratina 18 se administra una o varias veces al día, la dosis preferible de proteínas citoqueratina 18 es de 0,01 mg/kg – 100 mg/kg. Esta dosis se puede modificar en función de varios factores, tales como el tipo de enfermedad que se va a tratar, la gravedad de la enfermedad, los tipos y cantidades de principios activos y otros ingredientes contenidos en la composición, la edad, el peso, el estado de salud general y el sexo del paciente, la dieta, el momento y la vía de administración, la velocidad de secreción de la composición, el periodo de los fármacos de tratamiento usados de forma simultánea etc.
- Asimismo, la presente invención proporciona el uso de la proteína citoqueratina 18 en el que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2. 2 para la fabricación de un medicamento para la EPOC.
- La composición diagnóstica que comprende proteína citoqueratina 18 como se ha divulgado en el presente documento puede reaccionar con muestras biológicas de pacientes con EPOC, de modo que muestra resultados positivos. Por tanto, la composición diagnóstica se puede usar para el diagnóstico de la EPOC.
- La composición diagnóstica divulgada en el presente documento que comprende la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 se puede usar para detección, diagnóstico y clasificación de EPOC con mayor sensibilidad, como se muestra en los presentes Ejemplos.
- La composición diagnóstica puede comprender una solución tampón o de reacción que hace que se mantenga la actividad fisiológica o la estructura de las proteínas, además de las proteínas. Asimismo, la composición diagnóstica se puede proporcionar en forma de polvo, o en estado solubilizado en un tampón adecuado, o mantenerse a 4 °C, con el fin de mantener la estabilidad.
- Se describe un kit diagnóstico para el diagnóstico de la EPOC que comprende la composición diagnóstica que comprende proteína citoqueratina 18 para diagnosticar la EPOC.
- El kit diagnóstico puede comprender una solución tampón o de reacción que hace que se mantenga la actividad fisiológica o la estructura de las proteínas, además de las proteínas citoqueratina 18. Además, las proteínas se pueden proporcionar en forma de polvo, o en estado solubilizado en un tampón adecuado, o mantenerse a 4 °C, con el fin de mantener la estabilidad.
- El kit diagnóstico puede comprender componentes distintos a la proteína citoqueratina 18. Para el resultado de control positivo, el kit diagnóstico puede comprender anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales frente a la proteína citoqueratina 18 de mamíferos, o de muestras biológicas humanas de las cuales los autoanticuerpos frente a la proteína citoqueratina 18 son positivos. Para el resultado del control negativo, el kit diagnóstico puede comprender otros anticuerpos o tampones. En caso necesario, el kit diagnóstico puede comprender además otros componentes requeridos para la detección de autoanticuerpos frente a la proteína citoqueratina 18 de muestras biológicas de sujetos.
- Otros componentes requeridos para la reacción de inmuodetección incluyen anticuerpos anti-IgG humanos producidos en rata, ratón, conejo, vaca, cerdo o cabra etc., como anticuerpos secundarios, y agentes colorantes,

tampones etc.

Como anticuerpos secundarios se pueden usar anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina (PA), conjugados con peroxidada de rábano (HRP), anticuerpos conjugados con biotina o anticuerpos conjugados con material fluorescente (por ejemplo, rodamina, rojo Texas, fluoresceína, ficoeritrina etc.).

5 Los anticuerpos secundarios conjugados con biotina pueden usar avidina conjugada con enzima AP o HRP, los anticuerpos secundarios conjugados con AP pueden usar BCIP/NBT como acopladores de color y los anticuerpos secundarios conjugados con HRP pueden usar DAB (diaminobencidina) etc. como acopladores de color, induciendo de este modo una reacción de color para determinar la presencia de autoanticuerpos. Los anticuerpos secundarios a los que se conjugan materiales fluorescentes se pueden monitorizar en un microscopio de fluorescencia. Por tanto, desde el microscopio de fluorescencia se puede detectar la presencia de autoanticuerpos.

10 Los procedimientos de ensayo aplicados al kit son conocidos para los expertos en la técnica. Los procedimientos de ensayo que se van a usar para el kit incluyen técnicas que pueden detectar reacción antígeno-anticuerpo, tales como inmunoensayos de fluorescencia, reacción del color enzima-sustrato, inmunoensayos enzimáticos, inmunotransferencia, ensayo de inmunoprecipitación, inmunoensayos de aglutinación antígeno-anticuerpo, inmunoensayos de dispersión de la luz, radioinmunoensayo, citometría de flujo, procedimiento de fijación del complemento.

El kit puede además comprender tubos, pocillos o placas requeridas para mezclar cada componente o un escrito de cobertura que describe mejor el modo de usarlo, en caso necesario

20 La presente invención proporciona un procedimiento in vitro de diagnóstico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica usando composiciones diagnósticas que contienen la proteína citoqueratina 18 como principio activo, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra biológica de un sujeto que se sospecha que tiene enfermedad pulmonar obstructiva crónica, tal como enfisema pulmonar o bronquitis crónica, con proteína citoqueratina 18 para inducir la formación del complejo inmunitario; y

25 (b) diagnosticar dicha enfermedad pulmonar obstructiva crónica en el sujeto mediante la detección del anterior complejo inmunitario para determinar la presencia de autoanticuerpos frente a dicha proteína citoqueratina 18,

30 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2, en la que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica se diagnostica cuando los pacientes se quejan de síntomas clínicos típicos, incluidos tos, esputo y disnea, y su FEV1 medido tras la inhalación de un broncodilatador mostraba menos del 80 % del valor previsto y la proporción de FEV1/FVC era inferior a 70 % en la prueba de la función pulmonar.

En la etapa (a) del presente procedimiento diagnóstico, las muestras biológicas pueden incluir cualquier fluido que se pueda aislar y recoger de cuerpos humanos, tales como sangre, plasma, suero, orina, lágrimas, saliva, esputo, secreción nasal, secreción bronquial, fluido de lavado bronquial, secreción pulmonar, fluido de lavado alveolar etc.

35 La formación del complejo inmunitario puede usar inmunotransferencia, ELISA etc., y puede usar cualquier procedimiento para detectar la reacción antígeno-anticuerpo, que son habituales en la técnica.

40 La etapa (b) del presente procedimiento diagnóstico es una etapa que determina la formación del complejo inmunitario induciendo reacciones colorimétricas o detectando fluorescencia del complejo inmunitario y puede usar cualquier procedimiento para detectar reacción antígeno-anticuerpo, que son habituales en la técnica. Si se confirma la presencia de complejo inmunitario, este resultado significa que el sujeto tiene EPOC. Para el resultado del control positivo, en lugar de las muestras biológicas del sujeto, lo que se puede usar son anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales frente a la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 de mamíferos, o muestras biológicas de seres humanos en las que los autoanticuerpos frente a la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 son positivos. Para el resultado del control positivo, lo que se puede usar son anticuerpos o tampones distintos a los anticuerpos frente a la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.

45 A partir de informes anteriores de estudios inmunológicos para otras enfermedades autoinmunitarias, se sabe que en el caso de los pacientes que muestran autoanticuerpos IgG específicos de las proteínas autoantígenos de la sangre, un número considerable de pacientes tiene reacción de linfocitos T específicos del antígeno frente a la misma proteína autoantigénica, lo que es útil para comprobar la hipersensibilidad de tipo retardada tras la inyección intradérmica de las mismas proteínas autoantigénicas que reaccionan con autoanticuerpos IgG en los pacientes (Beales PE y col., Autoimmunity 2000;32:109-113). En las técnicas anteriores, se han usado pruebas cutáneas de tipo tuberculina, en las que las pruebas se realizaron inyectando antígenos específicos a los sujetos, por vía intradérmica, y analizando la parte de piel en la que se ha inyectado tras de 24 a 72 horas de la inyección con el fin de medir el tamaño de la inflamación de la piel (induración), de modo que se determina la presencia de reacción de hipersensibilidad de tipo retardado o una reacción cutánea de inicio tardío frente al antígeno anterior.

De acuerdo con lo anterior, la composición diagnóstica que comprende la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 se puede aplicar al uso de la composición diagnóstica para detectar pacientes que muestran una respuesta autoinmunitaria a la proteína citoqueratina 18 entre pacientes con EPOC midiendo el tamaño de la inflamación de la piel tras de 24 a 72 horas de la inyección intradérmica de proteína citoqueratina 18.

Asimismo, la memoria descriptiva proporciona un procedimiento de diagnóstico de la EPOC usando una composición diagnóstica que comprende proteína citoqueratina 18.

El procedimiento descrito de diagnóstico de EPOC crónica comprende las etapas siguientes:

a) seleccionar un sujeto que se sospecha que tiene EPOC;

b) inyectar por vía intradérmica las composiciones diagnósticas que comprenden proteína citoqueratina 18 y

c) diagnosticar la EPOC examinando la parte de la piel inyectada tras 24 a 72 horas de la inyección y detectar la presencia de inflamación cutánea y medir el tamaño de la inflamación cutánea, determinando de este modo la presencia de reacción de hipersensibilidad de tipo retardado o reacción cutánea tardía a la proteína citoqueratina 18.

Usando la presente composición diagnóstica y el procedimiento diagnóstico, el resultado de la presencia de EPOC se puede obtener fácilmente y determinar correctamente. Por tanto, se puede usar con eficacia para un estudio clínico a gran escala. Asimismo, se puede usar para detectar agentes terapéuticos o desarrollar procedimientos de tratamiento de la EPOC.

La presente invención proporciona el uso de una composición para cribar un agente terapéutico para la EPOC, que comprende proteína citoqueratina 18 en el que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.

Las composiciones para cribar un agente terapéutico pueden comprender solución tampón o reacción que hace que se mantenga la actividad fisiológica o la estructura de las proteínas, además de la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos SEC ID N° 2. Asimismo, la composición se puede proporcionar en forma de polvo, o en estado solubilizado en un tampón adecuado, o mantenerse a 4 °C, con el fin de mantener la estabilidad.

Las presentes composiciones para cribar un agente terapéutico permiten la selección de un agente terapéutico para la EPOC mediante detección selectiva del material que inhibe la unión entre la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 y autoanticuerpos frente a la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 en las muestras biológicas obtenidas de pacientes con EPOC o inhibe la reacción citotóxica de los autoanticuerpos frente a la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.

Asimismo, la memoria descriptiva describe un procedimiento de cribado de un agente terapéutico para EPOC, usando composiciones que comprenden uno o más de proteína citoqueratina 18, anticuerpos frente a la proteína citoqueratina 18 o autoanticuerpos frente a la citoqueratina 18 de los pacientes con EPOC, como materiales diana.

El procedimiento de cribado de un agente terapéutico para EPOC comprende la etapa siguiente:

(a) aislar autoanticuerpos de muestras biológicas obtenidas de pacientes con EPOC;

(b) poner en contacto los materiales de ensayo con los autoanticuerpos obtenidos en la etapa (a); y

(c) seleccionar un agente terapéutico para la EPOC determinando si los materiales de ensayo pueden inhibir o no la unión de los autoanticuerpos a la proteína citoqueratina 18 o inhibir los efectos citotóxicos de los autoanticuerpos frente a las células que expresan proteína citoqueratina 18.

En el procedimiento descrito de cribado de un agente terapéutico, los materiales de ensayo pueden ser ácidos nucleicos, proteínas, extractos o compuestos que cabe esperar que tengan posibilidades de inhibidor para la EPOC de acuerdo con el procedimiento de selección habitual o seleccionados aleatoriamente.

En el procedimiento descrito de cribado de un agente terapéutico, para la confirmación de la reacción entre la composición para detección selectiva y los materiales de ensayo, se pueden usar procedimientos habituales usados para confirmar la reacción proteína-proteína, incluida la reacción antígeno-anticuerpo o la reacción proteína-compuesto.

Por ejemplo, se pueden usar los siguientes procedimientos: Un procedimiento que hace reaccionar las proteínas citoqueratina 18 o autoanticuerpos con el material de ensayo, de modo que se determina la actividad, el procedimiento de dos híbridos de levaduras, procedimiento de detección selectiva de clon de péptido de expresión en fagos que se une a las proteínas citoqueratina 18, el procedimiento de detección selectiva de alto rendimiento

(HTS) usando productos naturales, bibliotecas químicas etc., el procedimiento de HTS con fármaco, el procedimiento de detección selectiva basado en células o el procedimiento de detección selectiva usando matriz de ADN etc.

5 En la presente invención, los asuntos relacionados con tecnología de ingeniería genética quedarán más claros a partir de los contenidos de la bibliografía de Sambrook (Sambrook, y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)).

1. Una composición farmacéutica para usar en un procedimiento para prevenir o tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, que comprende la proteína citoqueratina 18 como principio activo, en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.

10 2. La composición para usar de acuerdo con el punto 1, en la que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica es enfisema pulmonar o bronquitis crónica.

3. Ek uso de la proteína citoqueratina 18 como principio activo para la fabricación de una composición farmacéutica para usar en un procedimiento para prevenir o tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, en el que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.

15 4. El uso de acuerdo con el punto 3, en la que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica es enfisema pulmonar o bronquitis crónica.

5. Un procedimiento in vitro de diagnóstico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica usando composiciones diagnóstico que contienen la proteína citoqueratina 18 como principio activo, que comprende las etapas de:

20 (a) poner en contacto una muestra biológica de un sujeto que se sospecha que tiene enfermedad pulmonar obstructiva crónica, con proteína citoqueratina 18 para inducir la formación del complejo inmunitario; y

25 (b) diagnosticar dicha enfermedad pulmonar obstructiva crónica en el sujeto mediante la detección del anterior complejo inmunitario para determinar la presencia de autoanticuerpos frente a dicha proteína citoqueratina 18,

30 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2, en la que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica se diagnostica cuando los pacientes se quejan de síntomas clínicos típicos, incluidos tos, esputo y disnea, y su FEV1 medido tras la inhalación de un broncodilatador mostraba menos del 80 % del valor previsto y la proporción de FEV1/FVC era inferior a 70 % en la prueba de la función pulmonar.

6. El procedimiento del punto 5, en la que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica es enfisema pulmonar o bronquitis crónica.

35 7. Un uso de una composición que comprende la citoqueratina 18 como material diana para la detección selectiva un agente terapéutico para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.

8. El uso de acuerdo con el punto 7, en la que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica es enfisema pulmonar o bronquitis crónica.

9. Un procedimiento in vitro para ayudar en la detección de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en un sujeto humano, que comprende las etapas de:

40 (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto humano con la proteína citoqueratina 18 para formar un complejo inmunitario entre la proteína citoqueratina 18 y la muestra biológica con autoanticuerpos, y

45 (b) determinar la presencia de los autoanticuerpos contra dicha proteína citoqueratina 18 en la muestra biológica detectando el complejo inmunitario, en la que la presencia de los autoanticuerpos comporta una correlación positiva con la existencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica en el sujeto humano,

50 en el que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2, en la que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica se diagnostica cuando los pacientes se quejan de síntomas clínicos típicos, incluidos tos, esputo y disnea, y su FEV1 medido tras la inhalación de un broncodilatador mostraba menos del 80 % del valor previsto y la proporción de FEV1/FVC era inferior a 70 % en la prueba de la función pulmonar.

10. El procedimiento del punto 9, en la que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica es enfisema pulmonar o bronquitis crónica.

Efectos ventajosos

Como se ha descrito anteriormente, la proteína citoqueratina 18 se identifica como autoantígenos reconocido por los autoanticuerpos en las muestras de suero de pacientes con EPOC. Por tanto, una composición farmacéutica de la presente invención que comprende la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 como principio activo se puede usar como medicamento para prevenir, aliviar y tratar la EPOC mediante la inhibición de citotoxicidad inducida por autoanticuerpos a las células epiteliales de las vías respiratorias y la inhibición del desarrollo secundario de la inflamación crónica epitelial de las vías respiratorias inducida por la formación de complejos inmunitarios compuestos por autoanticuerpos y autoantígeno.

Asimismo, una composición diagnóstica que comprende la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 se puede usar para detectar, diagnosticar o clasificar la EPOC.

Descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra análisis de inmunotransferencia de las proteínas (A549) de las células epiteliales de las vías respiratorias humanas que reaccionan con autoanticuerpos IgG en muestras de suero de controles sanos, pacientes con enfisema pulmonar que tienen una función pulmonar normal y pacientes con EPOC;

La Fig. 2 muestra detección por inmunotransferencia de autoanticuerpos IgG frente a la proteína citoqueratina 18 humana recombinante en muestras de suero de controles sanos, pacientes con enfisema pulmonar que tienen una función pulmonar normal y pacientes con EPOC;

La Fig. 3 muestra las uniones de los autoanticuerpos IgG en muestras de suero de EPOC con las proteínas citoqueratina 18 humanas y la proteína citoqueratina 18 bovina purificada disponible comercialmente detectada mediante análisis de inmunotransferencia;

La Fig. 4 muestra la detección de citotoxicidad inducida por anticuerpos a las células epiteliales de las vías respiratorias humanas (A549) mediante anticuerpos IgG purificados de muestras de sangre de pacientes con EPOC.

La Fig. 5 muestra inhibiciones de la citotoxicidad inducida por autoanticuerpos de IgG a las células epiteliales de las vías respiratorias humanas (A549) cuando los anticuerpos IgG de pacientes con EPOC se absorbieron con la proteína citoqueratina 18 humana antes de la adición a las células epiteliales de las vías respiratorias:

Mejor modo

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se explica más específicamente mediante los Ejemplos. No obstante, los ejemplos siguientes se proporcionan con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

**[Ejemplo 1] Detección de autoanticuerpos IgG frente a la proteína citoqueratina 18 en muestras de suero de pacientes con EPOC**(1-1) SujetosSujetos

Los inventores han examinado muestras de suero obtenidas de 9 pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), 2 pacientes con enfisema pulmonar que muestran una función pulmonar normal y 58 controles sanos. El diagnóstico de EPOC se determinó mediante el criterio recientemente publicado de NHLBI/WHO GOLD Workshop summary (Am J Respir Crit Care Med 2001;163:1256-1276). Los 2 pacientes con enfisema pulmonar tenían antecedentes de tabaquismo de más de 10 paquete-años. Se han quejado cínicamente de síntomas de disnea y la radiografía torácica mostraba hallazgos compatibles con enfisema pulmonar. No obstante, tenían hallazgos normales con valores de FEV1 (volumen espiratorio forzado en un segundo) y FVC (capacidad vital forzada) mayores del 80 % del valor previsto sobre la prueba de la función pulmonar. Los 9 pacientes con EPOC tenían antecedentes clínicos compatibles con EPOC, tales como tos, esputo, disnea etc. Asimismo, su FEV1 medido tras la inhalación de un broncodilatador mostraba menos del 80 % del valor previsto en la prueba de función pulmonar y la proporción de FEV1/FVC era inferior a 70 %. Todos los pacientes con EPOC tenían antecedentes de tabaquismo de más de 10 paquete-año, pero no tenían signos de tuberculosis u otras enfermedades pulmonares en la radiografía torácica. Las muestras de suero de los pacientes con EPOC se almacenaron a -20 °C.

(1-2) Cultivo celular

La línea de células epiteliales de las vías respiratorias humana A549 (ATCC CCL-185; Giard y col., J Natl Cancer Inst 1973; 51:1417-23) se obtuvo de la Colección Americana de cultivos Tipo (ATCC, VA, EE.UU.) y se cultivó según recomienda la ATCC.

(1-3) Extracción de proteínas celulares y análisis de inmunotransferencia

El análisis de inmunotransferencia se realizó con las células epiteliales de las vías respiratorias humanas y las muestras de suero obtenidas de los controles sanos y pacientes con EPOC de acuerdo con el ejemplo anterior (1-1) para identificar proteínas de células epiteliales de las vías respiratorias humanas que se unen a los autoanticuerpos IgG en el suero.

- 5 En primer lugar, con el fin de extraer proteínas de las células epiteliales de las vías respiratorias humanas A549 en el punto (1-2) anterior, las células cultivadas se lisaron en tampón de lisis que contenía Tris/HCl 10 mM, pH 7,2, dodecilsulfato sódico (SDS) al 2 %, NaCl 158 mM y ditioneitol 10 mM.

10 Las proteínas en los lisados celulares se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) discontinua. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Tras la transferencia, la membrana de PVDF se trató con solución salina tamponada con Tris (TBS) que contiene 5 % de suero bovino, 10 % de leche desnatada en polvo y 0,1 % de Tween 20 durante una o más horas, para bloquear las uniones inespecíficas de las proteínas al PVDF y, después, la membrana de PVDF se cortó en tiras de 4 mm. Las tiras cortadas se hicieron reaccionar con suero de pacientes diluido en el mismo tampón en 1:100 (v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar, se incubó la membrana con anticuerpos IgG anti-humanos de cabra conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado final, la membrana se tiñó con una solución de BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato/nitroazul tetrazolio; Sigma) durante 5 minutos para detectar las proteínas que han reaccionado con el suero del paciente. Para comparar con resultados de 15 pacientes con otra enfermedad, en los experimentos también se incluyó una muestra de suero de un paciente con asma no alérgico que una detección de autoanticuerpos IgG frente a la citoqueratina 18 se ha confirmado con 20 informes previos de los inventores (Nahm DH, y col., Am J Respir Crit Care Med 2002;165:1536-9).

25 Con el fin de minimizar errores técnicos en la tasa de detección de cada ensayo, cada ensayo comprendió un suero estándar positivo y un suero control negativo. Los resultados de los ensayos se evaluaron mediante al menos dos investigadores de forma independiente a simple vista. Cuando el suero de ensayo mostró una banda fuerte a ciertas proteínas de células epiteliales de las vías respiratorias en comparación con el suero control negativo, la intensidad teñida de la banda fue la misma o más fuerte que la del suero estándar positivo y el resultado leído por dos 30 investigadores correspondía a cada uno, caso que se definió como la detección positiva de autoanticuerpos.

El anticuerpo monoclonal de ratón frente a la proteína citoqueratina 18 (clon CK5, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), el anticuerpo de cabra frente a la proteína alfa-enolasa humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y sus anticuerpos secundarios conjugados con la fosfatasa alcalina se incluyeron en cada experimento para confirmar la localización de las proteínas autoantigénicas en reacción cuando se leyeron los resultados de detección de los autoanticuerpos frente a las proteínas de las células epiteliales de las vías respiratorias.

35 La proteína autoantigénica diana se determinó comparando y analizando los resultados de la localización en inmunotransferencia de las proteínas de las células epiteliales de las vías respiratorias sobre la membrana de PVDF que reaccionan con los autoanticuerpos IgG de pacientes y las proteínas de las células epiteliales de las vías respiratorias que reaccionan con anticuerpos monoclonales de ratón contra la proteína citoqueratina 18 (clon CK5, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) o el anticuerpo de cabra frente a la proteína alfa-enolasa humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) en los puntos de los patrones de tinción y los pesos moleculares.

40 La Fig. 1 muestra el resultado del análisis de inmunotransferencia de las proteínas (A549) de las células epiteliales de las vías respiratorias humanas que reaccionan con autoanticuerpos IgG en muestras de suero de controles sanos, pacientes con enfisema pulmonar que tienen una función pulmonar normal y pacientes con EPOC; Las calles 1 y 2 muestran los resultados para muestras de suero de controles sanos, las calles 3 y 4 muestran los resultados para las muestras de suero de pacientes con enfisema pulmonar que muestran una función pulmonar normal, las calles 5-13 muestran los resultados para las muestras de suero de pacientes con EPOC y la calle 4 muestran el resultado para una muestra de suero de un paciente con asma bronquial, la calle 15 muestra el resultado para anticuerpos monoclonales de ratón frente a la proteína citoqueratina 18 y la calle 16 muestra el resultado para anticuerpos de cabra frente a la alfa-enolasa.

45 La Fig. 1 muestra que los autoanticuerpos IgG frente a la banda proteica correspondiente a la proteína citoqueratina 18 identificada por anticuerpos monoclonales de ratón se detectaron en 8 (89 %) de un total de 9 pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Este resultado mostró una tasa de detección significativamente mayor que la de los controles sanos (5 de 58 controles sanos; 8,6 %) (prueba de chi-cuadrado,  $p < 0,05$ ).

(1-4) Detección de autoanticuerpos en muestras de sangre de pacientes con EPOC que usan la proteína citoqueratina 18 humana recombinante

55 Usando el suero de los sujetos anteriores de (1-3) y la *proteína citoqueratina 18 humana recombinante disponible comercialmente* (Research Diagnostics INC., Pleasant Hill Road Flanders, NJ) producida a partir de E. coli mediante la tecnología de ingeniería genética se realizó inmunotransferencia en la misma disposición de la muestra que en la Fig. 1. Los resultados se muestran en la Fig. 2.

La Fig. 2 muestra detección por inmunotransferencia de autoanticuerpos IgG frente a la proteína citoqueratina 18

humana recombinante usando muestras de suero de controles sanos, pacientes con enfisema pulmonar que tienen una función pulmonar normal y pacientes con EPOC; Las calles 1 y 2 muestran los resultados para muestras de suero de controles sanos, las calles 3 y 4 muestran los resultados para las muestras de suero de pacientes con enfisema pulmonar que muestran una función pulmonar normal, las calles 5-13 muestran los resultados para las muestras de suero de pacientes con EPOC y la calle 4 muestran el resultado para una muestra de suero de un paciente con asma bronquial, la calle 15 muestra el resultado para anticuerpos monoclonales de ratón frente a la proteína citoqueratina 18 y la calle 16 muestra el resultado para anticuerpos de cabra frente a la alfa-enolasa.

Como se muestra en la Fig. 2, los autoanticuerpos IgG frente a la proteína citoqueratina 18 humana recombinante se detectaron claramente en 3 (33,3 %) de 9 pacientes con EPOC (calles 7, 11 y 13). Los autoanticuerpos IgG frente a la proteína citoqueratina 18 humana recombinante también se detectaron en otros 5 pacientes con EPOC (calles 5, 6, 8, 9, 10 en la Fig. 2) y dos pacientes con enfisema pulmonar que muestran función pulmonar normal (Calle 3, 4 en la Fig. 2).

Como los resultados de la Fig. 2 eran consistentes con los resultados de la Fig. 1, se confirmó que el autoantígeno que reacciona con los autoanticuerpos IgG en las muestras de suero de pacientes con EPOC era la proteína citoqueratina 18 humana.

Como se muestra en la Fig. 1 y la Fig. 2, los autoanticuerpos IgG frente a la proteína citoqueratina 18 recombinante o la proteína citoqueratina 18 en las células epiteliales de las vías respiratorias se detectaron positivamente en pacientes con EPOC.

Por tanto, se reconfirmó que el autoantígenos que reacciona con los autoanticuerpos IgG en las muestras de suero de pacientes con EPOC era la proteína citoqueratina 18 (Fig. 2).

**[Ejemplo 2] Análisis de inmunotransferencia para la proteína citoqueratina 18 bovina**

Con el fin de determinar si los autoanticuerpos IgG en las muestras de suero de pacientes con EPOC reaccionan de forma selectiva con la proteína citoqueratina 18 humana o podrían reaccionar con las proteínas citoqueratina 18 de otros mamíferos, los inventores realizaron inmunotransferencia.

La reacción de los autoanticuerpos IgG en muestras de suero de 3 pacientes con EPOC con proteína citoqueratina 18 humana recombinante y proteína citoqueratina 18 bovina purificada (Research Diagnostics INC., Pleasant Hill Road Flanders, NJ) se detectó y comparó mediante análisis de inmunotransferencia de acuerdo con el procedimientos de (1-3). Los resultados se muestran en la figura 3.

La Fig. 3 muestra los resultados que muestran la comparación de la reacción de autoanticuerpos IgG en muestras de suero de pacientes con EPOC con proteína 18 de citoqueratina humana recombinante y proteína 18 de citoqueratina bovina purificada. Las calles 1, 3, 5 y 7 muestran los resultados de la proteína 18 de citoqueratina humana recombinante y las calles 2, 4, 6 y 8 muestran los resultados de la proteína 18 de citoqueratina bovina purificada. Las calles 1 y 2, las calles 3 y 4 y las calles 5 y 6 muestran los resultados obtenidos mediante la reacción con 3 muestras de suero de 3 pacientes con EPOC, y las calles 7 y 8 muestran el resultado de la reacción con anticuerpos monoclonales de ratón frente a la proteína 18 de citoqueratina.

A partir de los resultados obtenidos usando las muestras de suero de 3 pacientes con EPOC, se confirmó que los autoanticuerpos IgG contra la citoqueratina 18 en sus muestras de suero podrían reaccionar con la proteína citoqueratina 18 bovina que tiene el mismo peso molecular que la proteína citoqueratina 18 humana.

Como se ha mostrado anteriormente, los resultados del ensayo de autoantígenos-autoanticuerpos usando la proteína citoqueratina 18 humana recombinante humana y la proteína citoqueratina 18 bovina purificada correspondía una a otra. Por tanto, se confirmó que la proteína citoqueratina 18 bovina se podía usar para detectar autoanticuerpos en muestras de suero de pacientes con EPOC.

**[Ejemplo 3] Inhibición de la citotoxicidad inducida por anticuerpos IgG a las células epiteliales de las vías respiratorias mediante la administración de proteína citoqueratina 18**

(3-1) Confirmación de la citotoxicidad a las células epiteliales de las vías respiratorias mediante autoanticuerpos IgG

La citotoxicidad a las células epiteliales de las vías respiratorias mediante autoanticuerpos IgG se midió mediante el procedimiento de microcitotoxicidad usando la bandeja de Terasaki y modificando antes del procedimiento indicado (Martin S, y col., Tissue Antigens 1991;37:152-155).

En el ensayo anterior, los anticuerpos IgG se aislaron de muestras de plasma de 2 pacientes con EPOC y un control sano, en el que los pacientes con EPOC tenían autoanticuerpos IgG frente a la proteína citoqueratina 18 humana.

Los anticuerpos IgG de 1 control sano se aislaron para obtener una pureza del 90 % usando precipitación en etanol y ultrafiltración de acuerdo con el procedimiento de preparación anterior de anticuerpos IgG (Lebing W y col., Vox Sang 2003;84:193-201). Los anticuerpos IgG de 2 pacientes con EPOC se aislaron en una pureza mayor del 95 % mediante cromatografía de afinidad usando una columna de proteína A. La pureza de los anticuerpos IgG aislados

se determinó mediante SDS-PAGE y tinción proteica. Asimismo, la cantidad de endotoxina en la solución de anticuerpos IgG aislados se midió cuantitativamente usando LAL (lisado de amebocitos del Limulus). Como resultado, la contaminación de endotoxina no se detectó.

5 Los anticuerpos IgG humanos usados para administración intravenosa (IVglobulin, Green Cross Pharmaceutical Co., Korea) se obtuvieron comercialmente y se usaron como anticuerpos IgG control, en los que los anticuerpos IgG control se aislaron de plasma de un gran número de donantes de sangre, para obtener una pureza de más del 95 %.

10 En primer lugar, los anticuerpos IgG humanos anteriores se diluyeron usando medio DMEM/F12 a concentraciones de 5 mg/ml, 1 mg/l y 0,2 mg/ml. Después, las muestras diluidas se introdujeron en una bandeja de Terasaki de 96 pocillos a una proporción de 1 µl/pocillo por cuadruplicado. Asimismo, las muestras que solo contienen medio DMEM/F12 se introdujeron en una bandeja de Terasaki de 96 pocillos por cuadruplicado como controles negativos.

15 La línea celular epitelial de las vías respiratorias humanas A549 cultivada se trató con tripsina/EDTA y se aisló, después 1 µl (2.000 células/µl de la solución se introdujo en cada uno de los pocillos anteriores. Con el fin de prevenir la evaporación de la solución, 5 µl de aceite mineral se introdujeron en los pocillos. Y, después, los pocillos se hicieron reaccionar durante 2 horas y 30 minutos. En los pocillos se introdujo 5 % de pigmento de eosina Y (Sigma Chemical Co.) a una proporción de 5 µl/pocillo para fijar las células teñidas. Después, la solución de formalina se introdujo en los pocillos a una proporción de 5 µl/pocillo para fijar las células teñidas. Se colocó un cubreobjetos y el número de células sin daños de membrana celular se contó mediante microscopía óptica para determinar la citotoxicidad.

20 La citotoxicidad para las células epiteliales de las vías respiratorias por anticuerpos IgG se expresó como el % de histólisis de acuerdo con la siguiente ecuación, comparando el número medio de células en los pocillos que reaccionan con las muestras y el número medio de células en los pocillos de control negativo que solo contienen medio DMEM/F12.

#### [Ecuación 1]

25 **Citotoxicidad (% de citólisis) = [(número medio de células en los pocillos control negativo – número medio de células en los pocillos que contienen las muestras) / número medio de células en los pocillos control negativos] x 100**

El resultado del ensayo se obtuvo por cuadruplicado en cada muestra y después se expresó en términos de media y desviación estándar.

30 La Fig. 4 muestra que los anticuerpos IgG aislados de muestras de plasma de 2 pacientes con EPOC (paciente 1 y paciente 2) muestran una citotoxicidad significativamente mayor que los anticuerpos IgG comerciales obtenidos de múltiples donantes sanos usados para administración intravenosa (globulina IV, controles normales 1) o anticuerpos IgG aislados de plasma de un control sano (control normal 2) en la condiciones de 1 µg/pocillo y 5 µg/pocillo (prueba t, p < 0,05).

35 (3-2) Inhibición de la citotoxicidad inducida por anticuerpos IgG a las células epiteliales de las vías respiratorias por la proteína citoqueratina 18

40 Con el fin de absorber los autoanticuerpos frente a la proteína citoqueratina 18 de pacientes con EPOC, 50 µg de la proteína citoqueratina 18 humana purificada de acuerdo con el informe anterior de los inventores (Nahm DH, y col., Am J Respir Crit Care Med 2002;165:1536-9) y 50 µg de la proteína de citoqueratina humana purificada como control negativo se sometieron a electroforesis y se transfirieron a membrana de PVDF. Las membranas de PVDF que contienen proteína citoqueratina 18 humana o proteína citoqueratina 19 humana se cortaron en pequeñas porciones y se transfirieron a tubos de Eppendorf por separado.

45 50 µg de anticuerpos IgG que se aislaron de muestras de suero de 2 pacientes con EPOC y diluidos en medio DMEM/F12 para tener una concentración de 5 mg/ml se mezclaron con porciones de membrana de PVDF que contienen 50 µg de proteína citoqueratina 18 humana o proteína citoqueratina 19 humana y, después, las mezclas se hicieron reaccionar durante 16 horas a 4 °C. Tras la reacción, el sobrenadante se recogió mediante centrifugación y la citotoxicidad para las células epiteliales de las vías respiratorias humanas por los anticuerpos IgG se midió en el procedimiento anterior (3-1).

El resultado del experimento se obtuvo en 6 experimentos independientes de cada muestra y después se expresó en términos de media y desviación estándar.

50 La Fig. 5 muestra que cuando los anticuerpos IgG de pacientes con EPOC (paciente 1, 2) se adsorbieron con la proteína citoqueratina 18 humana antes de la adición a las células epiteliales de las vías respiratorias, la citotoxicidad para las células epiteliales de las vías respiratorias mediante autoanticuerpos IgG (mostrada como "CK18" en cada gráfico) se redujo significativamente en comparación con el caso de adsorción con la misma cantidad de proteína citoqueratina 19 humana usada como antígeno control (mostrada como "CK19" en cada gráfico) (Tabla 1) (prueba t, p < 0,001).

55

[TABLA 1]

Pacientes	Absorción con proteína citoqueratina 19 (% de histolisis)	Absorción con proteína citoqueratina 18 (% de histolisis)
Paciente 1	61,9 ± 6,4*	13,7 ± 4,5
Paciente 2	37,2 ± 6,2*	1,8 ± 2,7
*: p < 0,01		

5 Los resultados anteriores muestran que la proteína citoqueratina 18 se pueden usar para la inhibición de la reacción citotóxica a las células epiteliales de las vías respiratorias inducida por autoanticuerpos de IgG a la proteína citoqueratina 18 en la sangre de pacientes con EPOC.

De acuerdo con esto, es evidente que el efecto citotóxico y el efecto inflamatorio de los autoanticuerpos IgG se pueden reprimir si la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 de la presente invención se administra a pacientes con EPOC.

**Aplicabilidad industrial**

10 Como se ha descrito anteriormente, la proteína citoqueratina 18 se identifica como autoantígenos reconocido por los autoanticuerpos en las muestras de suero de pacientes con EPOC. Por tanto, una composición farmacéutica de la presente invención que comprende la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 como principio activo se puede usar como medicamento para prevenir, aliviar y tratar la EPOC mediante la inhibición de citotoxicidad inducida por autoanticuerpos a las células epiteliales de las vías respiratorias y la inhibición del desarrollo secundario de la inflamación crónica epitelial de las vías respiratorias inducida por la formación de complejos inmunitarios compuestos por autoanticuerpos y autoantígeno.

15 Asimismo, la presente invención se puede usar para una formulación farmacéutica que comprende la proteína citoqueratina 18 en el que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 o fragmentos de la misma para proteger a los pacientes con EPOC. La presente invención también se puede usar para identificar un compuesto farmacéutico capaz de inhibir la capacidad de unión de los autoanticuerpos frente a la proteína citoqueratina 18 de pacientes con EPOC frente a la proteína citoqueratina 18 en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 o células que expresan la citoqueratina 18 en las que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.

Listado de secuencias

25 <110> JEON, Sook-Yeong NAM, Dong-Ho

<120> Composición para la prevención, tratamiento y diagnóstico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

30 <130> NP06-0017

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

35 <210> 1

<211> 430

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40 <400> 1



ES 2 403 905 T3

	115		120		125														
Tyr	Phe	Lys	Ile	Ile	Glu	Asp	Leu	Arg	Ala	Gln	Ile	Phe	Ala	Asn	Thr				
	130					135								140					
Val	Asp	Asn	Ala	Arg	Ile	Val	Leu	Gln	Ile	Asp	Asn	Ala	Arg	Leu	Ala				
145					150					155					160				
Ala	Asp	Asp	Phe	Arg	Val	Lys	Tyr	Glu	Thr	Glu	Leu	Ala	Met	Arg	Gln				
				165					170						175				
Ser	Val	Glu	Asn	Asp	Ile	His	Gly	Leu	Arg	Lys	Val	Ile	Asp	Asp	Thr				
			180					185						190					
Asn	Ile	Thr	Arg	Leu	Gln	Leu	Glu	Thr	Glu	Ile	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu				
		195					200					205							
Glu	Leu	Leu	Phe	Met	Lys	Lys	Asn	His	Glu	Glu	Glu	Val	Lys	Gly	Leu				
	210					215						220							
Gln	Ala	Gln	Ile	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Thr	Val	Glu	Val	Asp	Ala	Pro				
225					230						235				240				
Lys	Ser	Gln	Asp	Leu	Ala	Lys	Ile	Met	Ala	Asp	Ile	Arg	Ala	Gln	Tyr				
				245					250					255					
Asp	Glu	Leu	Ala	Arg	Lys	Asn	Arg	Glu	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Trp	Ser				
			260					265						270					
Gln	Gln	Ile	Glu	Glu	Ser	Thr	Thr	Val	Val	Thr	Thr	Gln	Ser	Ala	Glu				
		275					280					285							
Val	Gly	Ala	Ala	Glu	Thr	Thr	Leu	Thr	Glu	Leu	Arg	Arg	Thr	Val	Gln				
	290					295					300								
Ser	Leu	Glu	Ile	Asp	Leu	Asp	Ser	Met	Arg	Asn	Leu	Lys	Ala	Ser	Leu				
305					310						315				320				
Glu	Asn	Ser	Leu	Arg	Glu	Val	Glu	Ala	Arg	Tyr	Ala	Leu	Gln	Met	Glu				
				325					330				335						

ES 2 403 905 T3

Gln Leu Asn Gly Ile Leu Leu His Leu Glu Ser Glu Leu Ala Gln Thr  
 340 345 350

Arg Ala Glu Gly Gln Arg Gln Ala Gln Glu Tyr Glu Ala Leu Leu Asn  
 355 360 365

Ile Lys Val Lys Leu Glu Ala Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Arg Leu Leu  
 370 375 380

Glu Asp Gly Glu Asp Phe Asn Leu Gly Asp Ala Leu Asp Ser Ser Asn  
 385 390 395 400

Ser Met Gln Thr Ile Gln Lys Thr Thr Thr Arg Arg Ile Val Asp Gly  
 405 410 415

Lys Val Val Ser Glu Thr Asn Asp Thr Lys Val Leu Arg His  
 420 425 430

<210> 2  
 <211> 429  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

5

<400> 2

Met Ser Phe Ser Thr Gln Ser Thr Phe Ser Asn Tyr Arg Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Ser Val Gln Ser Ser Gly His Arg Val Arg Pro Val Ser Ser Ala Ala  
 20 25 30

Ser Val Tyr Ala Gly Ala Gly Gly Ser Gly Ser Arg Ile Ser Val Ser  
 35 40 45

Arg Thr Thr Ser Val Arg Gly Gly Trp Gly Ser Gly Asn Leu Gly Ala  
 50 55 60

Gly Met Ala Gly Gly Leu Val Gly Val Gly Gly Ile Gln Gly Glu Lys  
 65 70 75 80



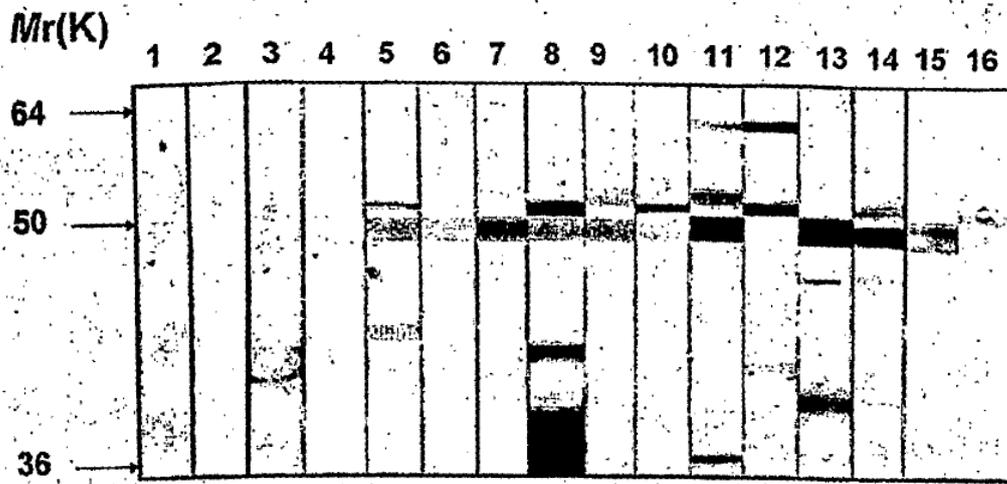
ES 2 403 905 T3

Gly Ala Ala Glu Met Thr Leu Thr Glu Leu Arg Arg Thr Val Gln Ser  
 290 295 300  
 Leu Glu Ile Asp Leu Asp Ser Met Arg Asn Leu Lys Ala Ser Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Asn Ser Leu Arg Glu Val Glu Ala Arg Tyr Ala Met Gln Met Glu Gln  
 325 330 335  
 Leu Asn Gly Val Leu Leu His Leu Glu Ser Glu Leu Ala Gln Thr Arg  
 340 345 350  
 Ala Glu Gly Gln Arg Gln Thr Gln Glu Tyr Glu Ala Leu Leu Asn Val  
 355 360 365  
 Lys Val Lys Leu Glu Ala Glu Ile Asn Thr Tyr Arg Arg Leu Leu Glu  
 370 375 380  
 Asp Gly Glu Asp Phe Ser Leu Gly Asp Ala Leu Asp Ser Ser Asn Ser  
 385 390 395 400  
 Arg Gln Thr Ile Gln Lys Thr Thr Thr Leu Arg Leu Val Asp Gly Lys  
 405 410 415  
 Val Val Ser Glu Thr Ser Asp Thr Lys Val Leu Arg His  
 420 425

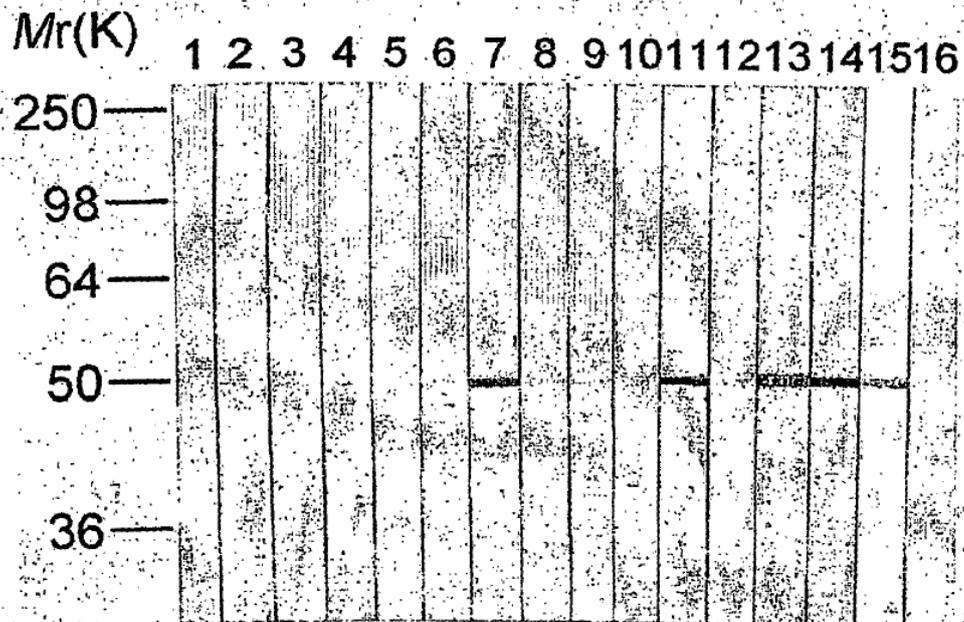
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento para prevenir o tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, que comprende la proteína citoqueratina 18 como principio activo, en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica es enfisema pulmonar o bronquitis crónica.
- 10 3. El uso de la proteína citoqueratina 18 como principio activo para la fabricación de una composición farmacéutica para usar en un procedimiento para prevenir o tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, en el que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica es enfisema pulmonar o bronquitis crónica.
- 15 5. Un procedimiento in vitro de diagnóstico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica usando composiciones diagnósticas que contienen la proteína citoqueratina 18 como principio activo, que comprende las etapas de:
- (a) poner en contacto una muestra biológica de un sujeto que se sospecha que tiene enfermedad pulmonar obstructiva crónica, con proteína citoqueratina 18 para inducir la formación del complejo inmunitario; y
- 20 (b) diagnosticar dicha enfermedad pulmonar obstructiva crónica en el sujeto mediante la detección del anterior complejo inmunitario para determinar la presencia de autoanticuerpos frente a dicha proteína citoqueratina 18,
- en el que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2, en la que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica se diagnostica cuando los pacientes se quejan de síntomas clínicos típicos, incluidos tos, esputo y disnea, y su FEV1 medido tras la inhalación de un broncodilatador mostraba menos del 80 % del valor predictivo y la proporción de FEV1/FVC era inferior a 70 % en la prueba de la función pulmonar.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en la que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica es enfisema pulmonar o bronquitis crónica.
7. Un uso de una composición que comprende la citoqueratina 18 como material diana para la detección selectiva un agente terapéutico para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, en la que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.
- 30 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica es enfisema pulmonar o bronquitis crónica.
9. Un procedimiento in vitro para ayudar en la detección de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en un sujeto humano, que comprende las etapas de:
- 35 (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto humano con la proteína citoqueratina 18 para formar un complejo inmunitario entre la proteína citoqueratina 18 y la muestra biológica con autoanticuerpos, y
- (b) determinar la presencia de los autoanticuerpos contra dicha proteína citoqueratina 18 en la muestra biológica detectando el complejo inmunitario, en la que la presencia de los autoanticuerpos comporta una correlación positiva con la existencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica en el sujeto humano,
- 40 en el que la proteína citoqueratina 18 tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2, en la que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica se diagnostica cuando los pacientes se quejan de síntomas clínicos típicos, incluidos tos, esputo y disnea, y su FEV1 medido tras la inhalación de un broncodilatador mostraba menos del 80 % del valor predictivo y la proporción de FEV1/FVC era inferior a 70 % en la prueba de la función pulmonar.
- 45 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en la que la enfermedad pulmonar obstructiva crónica es enfisema pulmonar o bronquitis crónica.

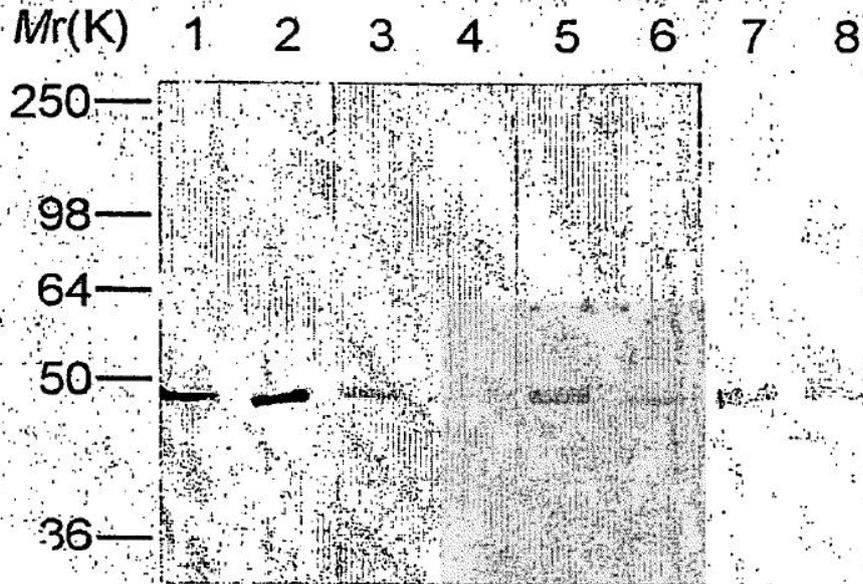
[Fig. 1]



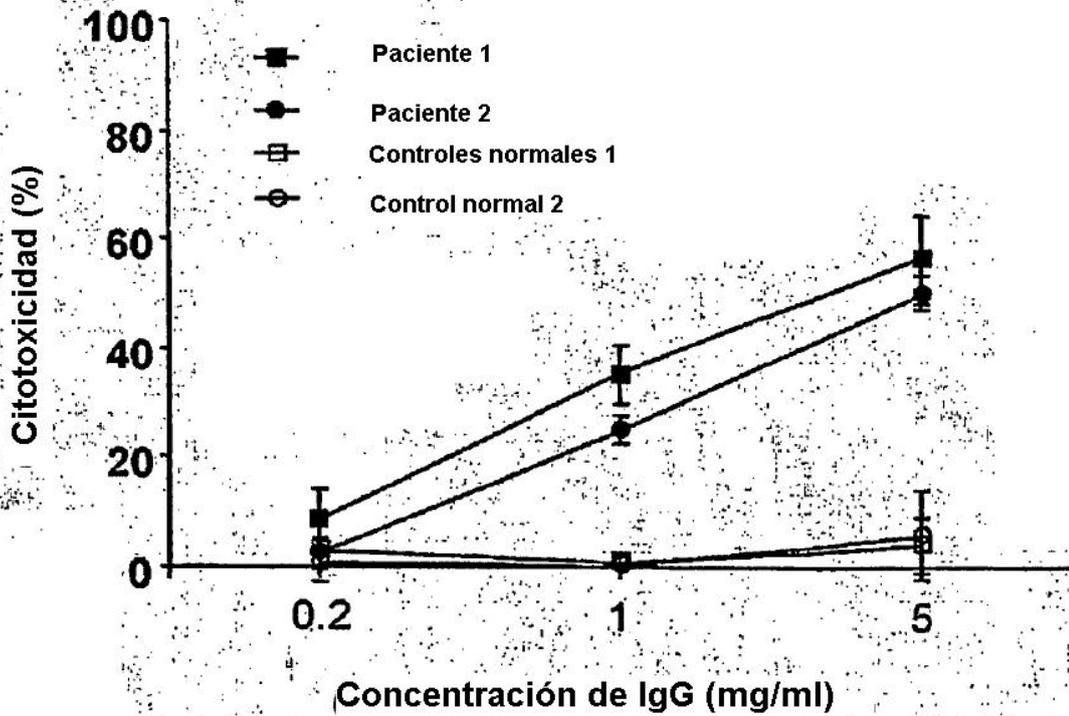
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]

