

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 526**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2015** E 15832727 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019** EP 3224619

54 Título: **Método para la detección de células inmunitarias específicas de antígeno en líquidos extrasanguíneos**

30 Prioridad:

29.11.2014 DE 102014018047

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

04.06.2019

73 Titular/es:

**GENOME IDENTIFICATION DIAGNOSTICS GMBH
(100.0%)
Ebinger Strasse 4
72479 Strassberg, DE**

72 Inventor/es:

**SCHMIDT, TINA;
SESTER, MARTINA y
SCHUB, DAVID**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 715 526 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la detección de células inmunitarias específicas de antígeno en líquidos extrasanguíneos

[0001] Las infecciones primarias y las reactivaciones de patógenos bacterianos y virales pueden conducir a complicaciones graves. En estos casos, diferentes patógenos muestran un tropismo para una región orgánica específica y son detectables en la sangre solo en cantidades bajas o en absoluto durante la fase de la enfermedad. Como detección indirecta para una lucha ocurrida en el organismo con un patógeno se pueden utilizar, en efecto, anticuerpos específicos de patógeno, sin embargo, en muchas enfermedades surge el problema que consiste en un vacío diagnóstico entre la infección y la subida detectable de títulos de anticuerpos. Además, en el caso de una reactivación o reinfección, el valor de un título de anticuerpos determinado único es bajo en la mayoría de los casos.

[0002] Como buen ejemplo de infecciones accesibles difíciles de diagnosticar valen las inflamaciones del sistema nervioso central (SNC) que pueden ir acompañadas de una tasa de mortalidad alta o daños consecuentes neurológicos graves [1,2]. El diagnóstico actual de las alteraciones bacterianas o virales del SNC está sujeto a numerosas limitaciones, que se representan en lo sucesivo a modo de ejemplo para las infecciones con alfa-herpesvirus (virus de la varicela-zóster (VZV) y virus del herpes simple 1 y 2 (HSV-1 y -2)). Por una parte, en las alteraciones del SNC, la erupción cutánea típica del herpes –el signo más evidente de una infección/reactivación del alfa-herpesvirus– aparece a menudo con retraso o no aparece en absoluto [3]. Por otra parte, la detección de patógenos utilizada como método de referencia mediante la PCR en el líquido cefalorraquídeo (LCR), particularmente con VZV, lleva a una determinada cantidad de resultados falsos negativos. Esto se debe al intervalo de tiempo limitado en el que generalmente son detectables los virus y puede hacer imposible un seguimiento adecuado de la infección. Por lo tanto, debido a que la detección de patógenos anamnésica y directa son insuficientes, se ofrece un punto de partida para un diagnóstico inmunológico. Ya se utilizan títulos aumentados de IgA específicos de virus como indicio para una enfermedad del SNC causada por virus, sin embargo, pudo observarse que, con determinadas enfermedades del SNC, como la esclerosis múltiple, también se produce un aumento de estos títulos de IgA independientemente de una reactivación [4], es decir, también en este caso el diagnóstico de anticuerpos presenta vacíos.

[0003] Otra medida diagnóstica es la determinación del número de células, así como la morfología celular de las células que se hallan en el LCR. Tanto en las infecciones del SNC bacterianas como también en las virales se produce el aumento del número de células en el LCR (pleocitosis), donde las infecciones bacterianas presentan más bien una acumulación de granulocitos y las infecciones virales una acumulación de linfocitos. Nuevas técnicas, que hasta ahora se aplican sobretodo en la sangre, permiten además una caracterización más precisa de la especificidad de las células. La cuantificación de las respuestas inmunitarias específicas de antígeno ocurre en este caso mediante la inducción de citocinas específica de linfocitos T tras la estimulación [5,6]. En el ejemplo de la meningitis causada por *M. tuberculosis* ya se pudo mostrar que, en las infecciones bacterianas, las células T específicas de patógeno existentes en el LCR se pueden detectar directamente en base a la expresión de interferón- γ [7]. Esta acumulación de células T específicas de antígeno en el lugar de una infección es un principio inmunológico general. También se halla correspondientemente, p.ej., en pacientes con tuberculosis pulmonar, una acumulación de células T específicas de patógeno en el lavado broncoalveolar [8,9]. Pero también muchas respuestas autoinmunitarias (por ejemplo, en la esclerosis múltiple) o respuestas inmunitarias indeseadas contra trasplantes transferidos van acompañadas de una acumulación específica del órgano de linfocitos dirigidos contra el antígeno respectivo. El análisis de estas células ofrece, por consiguiente, la posibilidad de examinar la respuesta inmune específica no solo de manera sistemática, sino también directamente en el lugar de la infección o la inflamación. Por consiguiente, p.ej., un diagnóstico basado en células T de enfermedades infecciosas de líquidos extrasanguíneos junto a la identificación del patógeno causante de la infección podría permitir una contribución importante para el seguimiento terapéutico [10,11]. La caracterización de la respuesta de las células T específica de antígeno a partir de sangre y líquidos extrasanguíneos siempre requiere, sin embargo, la realización de dos reacciones de estimulación separadas. Además, justo la detección de células T específicas en los líquidos extrasanguíneos es a menudo complicada o imposible técnicamente a causa del tamaño de muestra limitado (p.ej., en comparación con la sangre, el LCR está disponible solo en volúmenes bajos) o a causa del bajo número de células en las muestras recogidas.

[0004] En el ejemplo de nuestros resultados dentro del marco del desarrollo de un método diagnóstico basado en células T para infecciones del SNC causadas por VZV pudimos mostrar, además, que el número pequeño de las células presentadoras de antígeno (PCA) en líquidos extrasanguíneos (en este caso en el LCR) podría ser un factor adicionalmente limitante, que impide de manera adicional una activación dependiente de antígeno de las células T específicas de virus potencialmente existentes (Fig. 1). Para evitar estos pasos limitantes, en un nuevo ensayo se mezclan muestras de sangre total y extrasanguíneas de la misma persona y a continuación se estimulan con el antígeno de interés simultáneamente. Esto lleva a que tanto las células T específicas de antígeno de la sangre como también del líquido extrasanguíneo activen las PCA existentes en la sangre y causen una inducción de citocinas específica, por medio de las que se pueden identificar las células T específicas de

antígeno. La característica particular de nuestro nuevo método analítico es, por tanto, que todas las células extrasanguíneas se tiñen con un anticuerpo-CD45 acoplado a un fluorocromo antes de mezclarlas con las células sanguíneas. Esto lleva a que con el análisis concluyente se puedan discriminar células T de la sangre y células T del líquido extrasanguíneo en función de la ausencia o de la existencia de esta señal fluorescente, aunque se mezclaran entre sí las células durante el procesamiento (Fig. 2). La validez general de este principio se pudo confirmar en el examen de células T dirigidas específicamente contra los componentes del bacilo de Calmette-Guérin "BCG" (PPD) en líquido de lavado de la vejiga en pacientes con infecciones de BCG de la vejiga (Fig. 3).

[0005] Nuestro nuevo método de ensayo permite, por lo tanto, un análisis cuantitativo y cualitativo más sensible de células T específicas de antígeno a partir de líquidos extrasanguíneos, que podría encontrar aplicación como método de detección diagnóstico y para el seguimiento del éxito del tratamiento específico de patógeno, pero también en enfermedades orgánicas causadas por células T dirigidas contra aloantígenos o autoantígenos. Esta invención técnica permite además la posibilidad de la cuantificación y el análisis simultáneos de células T específicas de antígeno a partir de líquido extrasanguíneo y sangre y ofrece así la posibilidad de determinar en una única reacción de estimulación cambios de las células T específicas de antígeno en líquidos extrasanguíneos en comparación con la sangre. Además de los ejemplos presentados aquí este método de ensayo podría trasladarse a todos los demás patógenos –por ejemplo, con participación del SNC (p.ej., HSV-1 y 2, borrelia, virus de TBE) - y hacer allí una contribución decisiva al diagnóstico. El principio metódico se puede utilizar además para la identificación de células T específicas de patógeno de otros líquidos corporales (por ejemplo, lavado broncoalveolar, líquido pleural, líquido de lavado de la vejiga). Además, el enfoque metódico ofrece igualmente una ampliación del análisis de células T con especificidad contra otros antígenos no infecciosos y en consecuencia puede usarse también en pacientes con enfermedades autoinmunitarias, después de un trasplante de órganos o con tumores.

Palabras clave

[0006] inmunidad celular, infección viral, líquidos extrasanguíneos, sangre total, inmunodiagnóstico

Aclaraciones de los dibujos

[0007]

Fig. 1: ninguna detección de células T específicas de patógeno con estimulación de células del LCR. En ausencia de sangre no se pueden detectar tras la estimulación de las células T CD4 en el LCR células T CD4 activadas (CD69⁺IFN- γ ⁺) ni con el antígeno de control (Ko-VZV; control negativo) (A) ni con el antígeno del virus de la varicela-zóster (VZV) (B) (debajo respectivamente). Únicamente mediante la aplicación de un estímulo policlonal (SEB; control positivo) (C) es detectable una activación mediante las células T CD4 doblemente CD69-, así como interferón- γ (IFN- γ)-positivas. Los porcentajes se refieren, respectivamente, a la frecuencia de células T CD4 activadas (CD69⁺IFN- γ ⁺).

Fig. 2: análisis simultáneo de células T específicas de patógeno del líquido extrasanguíneo (LCR) y la sangre. La tinción previa de las células del LCR permite la discriminación de células de la sangre (CD45-negativas) y del LCR (CD45-positivas) con el anticuerpo-CD45 acoplado a un fluorocromo. (A) Se representa la separación de ambas poblaciones a nivel de linfocitos (izquierda) o células T CD4 (derecha). (B) Es detectable la expresión de interferón- γ (IFN- γ) de las células T CD4 específicas de VZV del LCR tras la estimulación en presencia de sangre de la misma persona, mientras que esta no es detectable en ausencia de sangre (véase la Fig. 1B). (C) Análisis simultáneo de la expresión de IFN- γ de células T CD4 específicas de VZV de la sangre. Los porcentajes se refieren respectivamente a la frecuencia de células T CD4 activadas (CD69⁺IFN- γ ⁺).

Fig. 3: Análisis simultáneo de células T específicas de patógeno de líquido extrasanguíneo (líquido de lavado de la vejiga) y sangre. La tinción previa de las células del lavado de la vejiga permite, con el anticuerpo-CD45 acoplado a un fluorocromo, la discriminación de las células de la sangre (CD45-negativas) y del lavado de la vejiga (CD45-positivas). (A) Se representa la separación de ambas poblaciones a nivel de linfocitos (izquierda) o células T CD4 (derecha). (B) Es detectable la expresión de interferón- γ (IFN- γ) de las células T CD4 específicas de PPD del líquido de lavado de la vejiga (vejiga) tras la estimulación en presencia de sangre de la misma persona –y, de hecho, con una frecuencia aumentada por encima del 40% frente a la estimulación sin sangre (compárese con (D)). (C) Análisis simultáneo de la expresión de interferón- γ de células T CD4 específicas de PPD de la sangre. (D) Análisis de la expresión de interferón- γ de células T CD4 específicas de PPD del líquido de lavado de la vejiga sin incubación con sangre. Los porcentajes se refieren respectivamente a la frecuencia de células T CD4 activadas (CD69⁺IFN- γ ⁺).

Literatura citada distinta de la de patentes

[0008]

1. Tyler, K.L., Herpes simplex virus infections of the central nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's. Herpes, 2004. 11 Suppl 2: P. 57A-64A.
2. Nagel, M.A. and D. Gilden, Complications of Varicella Zoster Virus Reactivation. Curr Treat Options Neurol, 2013.
3. Gilden, D., et al., Neurological disease produced by varicella zoster virus reactivation without rash. Curr Top Microbiol Immunol, 2010. 342: p. 243-53.
4. Reiber, H., S. Ungefehr, and C. Jacobi, The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. Mult Scler, 1998. 4(3): p. 111-7.
5. Letsch, A. and C. Scheibenbogen, Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. Methods, 2003. 31(2): p. 143-9.
6. Schmidt, T. and M. Sester, Detection of antigen-specific T cells based on intracellular cytokine staining using flow-cytometry. Methods Mol Biol, 2013. 1064: p. 267-74.
7. Thomas, M.M., et al., Rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis meningitis by enumeration of cerebrospinal fluid antigen-specific T-cells. Int J Tuberc Lung Dis, 2008. 12(6): p. 651-7.
8. Jafari, C., et al., Rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis by bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot. Am J Respir Crit Care Med, 2006. 174(9): p. 1048-54.
9. Jafari, C., et al., Impact of a Mycobacterium tuberculosis-specific interferon-gamma release assay in bronchoalveolar lavage fluid for a rapid diagnosis of tuberculosis. J Intern Med, 2011. 270(3): p. 254-62.
10. Malavige, G.N., et al., Rapid effector function of varicella-zoster virus glycoprotein I-specific CD4+ T cells many decades after primary infection. J Infect Dis, 2007. 195(5): p. 660-4
11. Schub, D. et al, Altered phenotype and functionality of Varicella Zoster virus-specific cellular immunity in individuals with active infection, J Infect Dis, 2015, 211(4), p. 600-12; publicado electrónicamente 01.09.2014.

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección mejorada de células inmunitarias específicas de antígeno en líquidos extrasanguíneos, consistente en los pasos siguientes:

- 5 - el aislamiento de las células inmunitarias vitales a partir de un líquido extrasanguíneo mediante los pasos de lavado y de centrifugación adecuados, p.ej. mediante la aplicación de suero fisiológico como tampón de lavado y de centrifugación a 200 hasta 500 g,
- la determinación del número total de células, por ejemplo, para cada preparación de estimulación se necesitan de 10^5 a $1,5 \times 10^6$ células,
- 10 - la tinción previa de las células inmunitarias aisladas con un anticuerpo acoplado a un fluorocromo que se dirige contra los antígenos expresados en las células, p.ej. CD45, o mediante fluorocromos adecuados para la tinción de células vitales, p.ej., succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína, CFDA-SE,
- la eliminación de anticuerpos o fluorocromos no unidos mediante pasos de lavado, **caracterizado por**
- la mezcla de las células inmunitarias teñidas previamente con sangre total heparinizada de la misma
- 15 persona,
- la estimulación de las muestras mezcladas con el antígeno de interés, con o sin adición de anticuerpos coestimulantes anti-CD49d y anti-CD28, anti-CD49d solo o anti-CD28 solo,
- la incubación durante 30 min a 4 h a 35 hasta 39 °C y 3 a 10% de CO₂,
- la adición de un inhibidor de secreción, p.ej. brefeldina A, monensina u otros,
- 20 - la incubación durante 2 a 12 horas a 35 hasta 39 °C y 3 a 10% de CO₂,
- la lisis de eritrocitos y fijación de los leucocitos,
- pasos de lavado para el aislamiento de los leucocitos,
- aumento de la permeabilidad de la membrana celular mediante la adición de una sustancia que aumenta la permeabilidad de la membrana celular, p.ej. saponina,
- 25 - la incubación con anticuerpos específicos marcados con fluorocromo contra marcadores de activación, p.ej., anti-CD69, anti-IFN- γ , durante al menos 10 min en hielo o a temperatura ambiente o a 35 hasta 39°C,
- nuevos pasos de lavado para la eliminación de los anticuerpos no unidos,
- el análisis de las células en un citómetro de flujo y la discriminación de las células inmunitarias del líquido extrasanguíneo de las de la sangre por medio de la señal fluorescente que se utilizó para la tinción previa,
- 30 p.ej., fluorocromo del anticuerpo-CD45, CFSE, donde las células reactivas contra el estímulo se distinguen de las células no reactivas mediante la positividad respecto a los marcadores de activación.

2. Método según la reivindicación 1, donde se realiza una preparación como control negativo, que es idéntica a dicha preparación de la reivindicación 1 a excepción de las adiciones de antígeno y donde, en vez del antígeno, se realiza la adición de una cantidad correspondiente de un tampón o disolvente fisiológico, p.ej. PBS o de un lisado celular no infectado o de una mezcla de proteínas o de péptidos no inmunoestimulante a las células inmunitarias de líquido extrasanguíneo y de sangre.

3. Método según la reivindicación 2, donde se realiza un control positivo mediante la adición de un estímulo policlonal, por ejemplo, enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*, SEB, a las células inmunitarias de líquido extrasanguíneo y sangre en una tercera preparación, que, por lo demás, es idéntica a dicha primera preparación.

4. Método según al menos una de las reivindicaciones 1 a 3, donde la relación entre la proporción relativa de las células inmunitarias activadas por el antígeno en líquidos extrasanguíneos y la proporción relativa de las células inmunitarias activadas por el antígeno en la sangre representa una medida de la actividad de la enfermedad en el compartimento corporal del que se obtuvo el líquido extrasanguíneo.

5. Método según al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, donde el líquido extrasanguíneo y la sangre son de origen humano.

6. Método según al menos una de las reivindicaciones 1 a 5, donde las células inmunitarias teñidas previamente se mezclan con 100 μ l a 1500 μ l de sangre total heparinizada por preparación de estimulación.

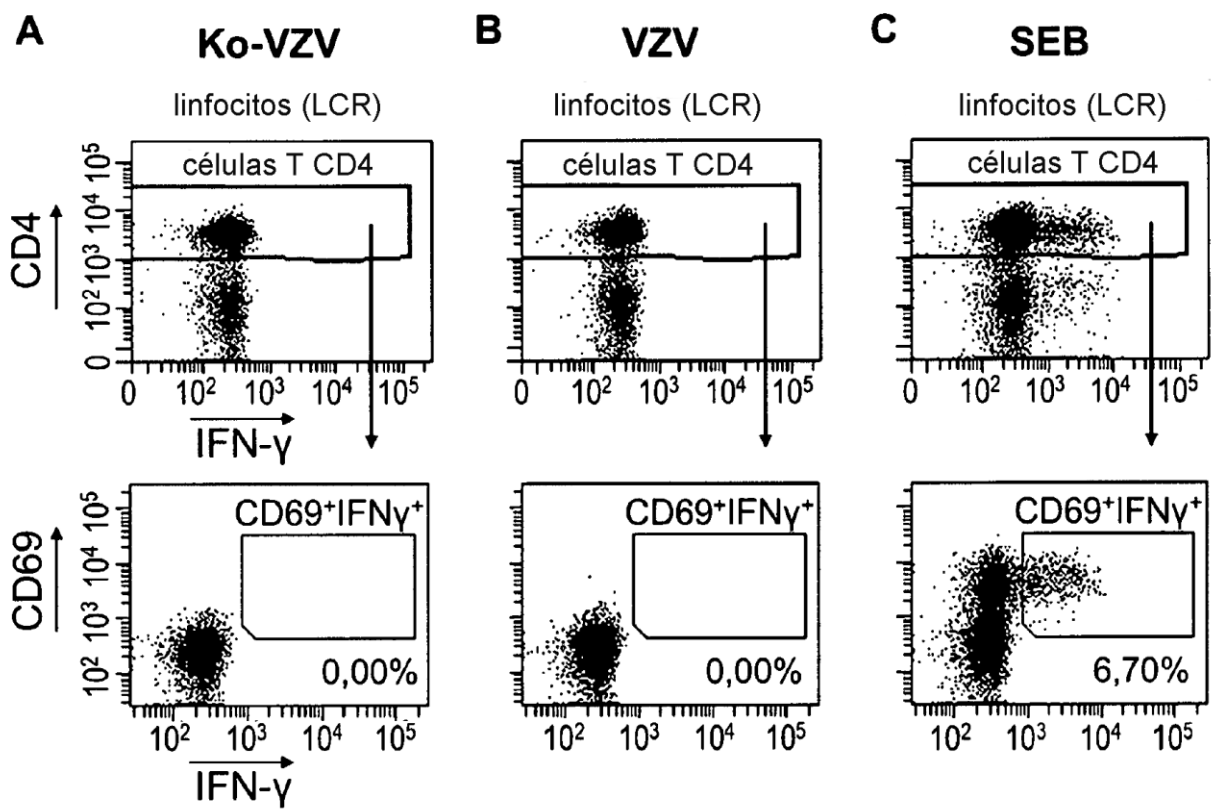


Fig. 1

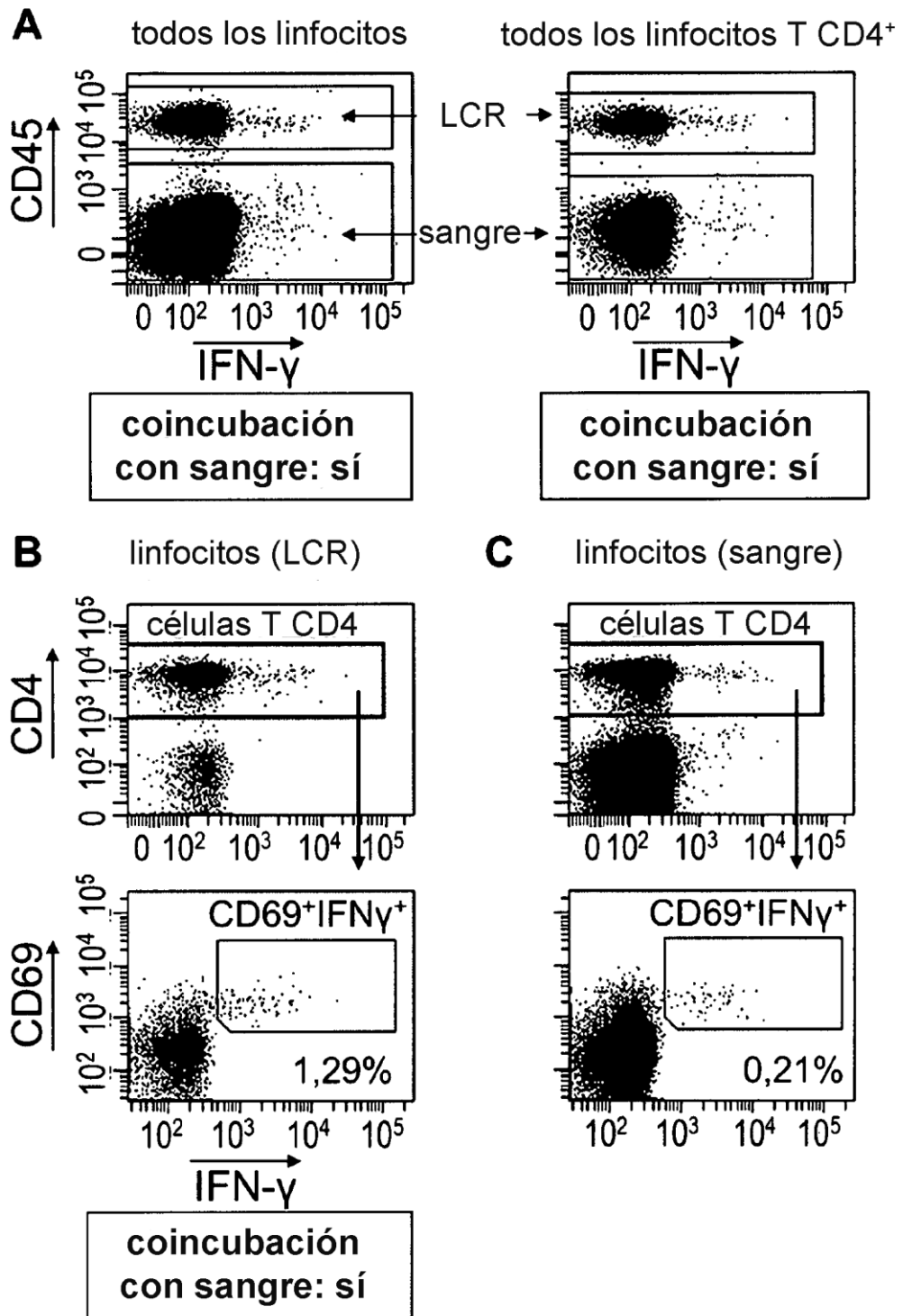


Fig. 2

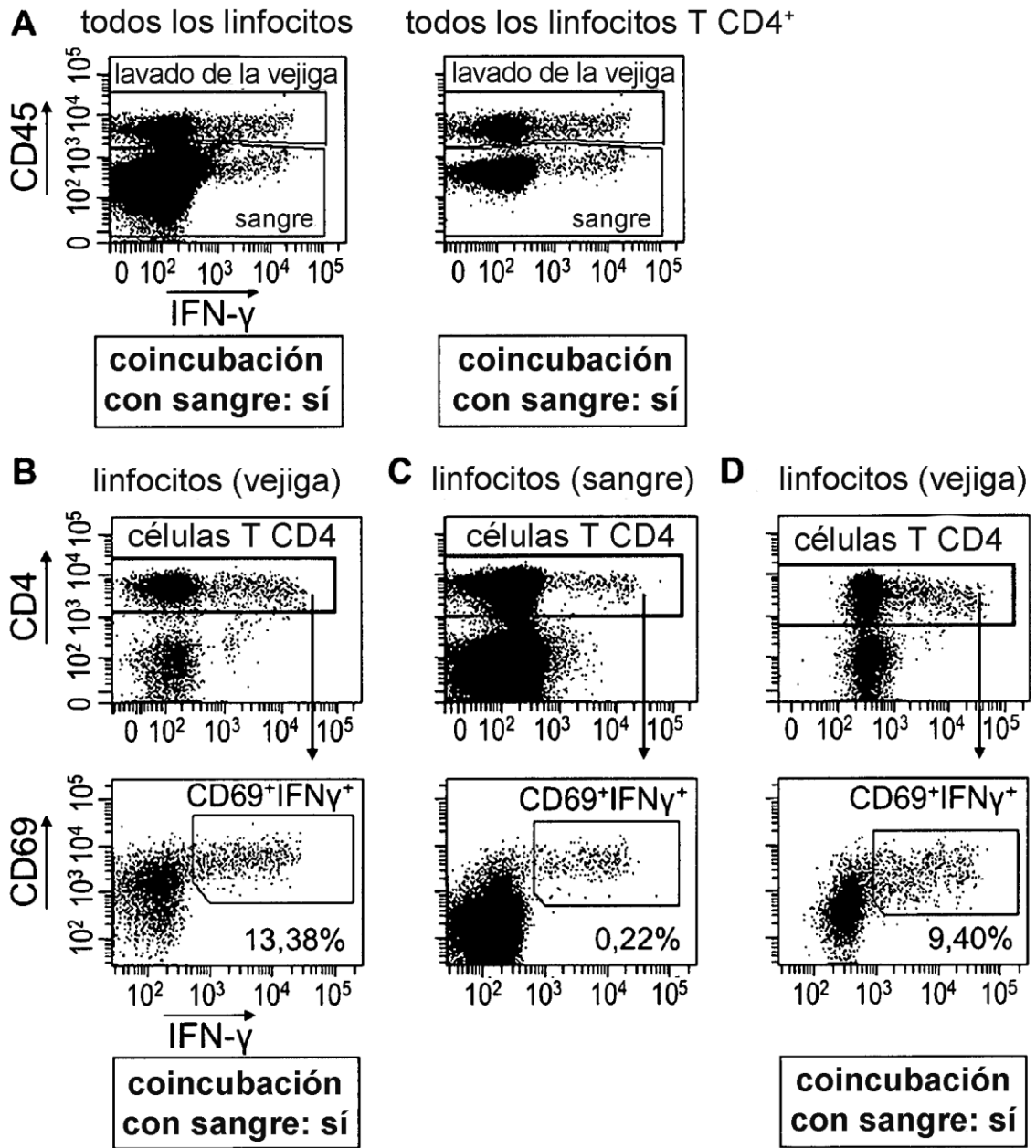


Fig. 3