

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 002**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2016 PCT/DE2016/000111**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16173573**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2016 E 16738349 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 3268742**

54 Título: **Método para la detección mejorada de células inmunitarias específicas de antígeno que infiltran el tejido**

30 Prioridad:

12.03.2015 DE 102015003141

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SESTER, MARTINA

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 733 002 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 mejorada de células inmunitarias específicas de antígeno que infiltran el tejido

[0001] Las infecciones, enfermedades tumorales, reacciones de rechazo o enfermedades autoinmunitarias están asociadas con infiltraciones de células T específicas de antígeno en el tejido asociado, cuya prueba tiene una importancia pronóstica para la valoración de la respectiva enfermedad. La prueba de las células T se realiza hasta ahora histológicamente en la sección de tejido o después del aislamiento de células de tejido. Sin embargo, estas técnicas no están limitadas o solo lo están en el caso de determinar la especificidad de antígeno de las células T situadas en el tejido. Los métodos de estimulación habituales para la prueba de células T específicas de antígeno, como se llevan a cabo en la sangre no son posibles con pequeñas cantidades, aisladas de células T de tejido (1).

[0002] En base a un método desarrollado recientemente para la prueba mejorada de células T específicas de antígeno de líquidos extrasanguíneos por estimulación combinada con sangre total (v. Solicitud de patente de nuestro laboratorio con el título "Neues Verfahren zum verbesserten Nachweis Antigen-spezifischer Immunzellen in extrasanguinen Flüssigkeiten" en la Oficina Alemana de Patentes (Deutsches Patentamt), publicado el 30.7.2015 como patente DE 10 2014 018 047 B3) cabe suponer que se permite optimizar la prueba de células T de tejido específicas de antígeno de forma similar por estimulación combinada de las células aisladas de tejido con sangre total de la misma persona. La cuantificación de las células específicas de antígeno se produce en este caso mediante citometría de flujo con ayuda de la inducción de citocinas específica de linfocitos T tras la estimulación (2,3). El análisis multiparamétrico por citometría de flujo ofrece adicionalmente la posibilidad de caracterización de la funcionalidad y diferenciación de las células inmunitarias que infiltran el tejido a través de la tinción de una multiplicidad de citocinas y moléculas superficiales.

[0003] Métodos hasta ahora usuales para la estimulación específica de antígeno de células T aisladas precisan un aislamiento costoso adicional de células que presentan antígeno, que se admiten en células T para la estimulación. En la invención aquí presente se mezclan de forma similar como con líquidos extrasanguíneos (v. Patente DE 10 2014 018 047 B3) las células aisladas de tejido y muestras de sangre total de la misma persona y a continuación se estimulan simultáneamente con el antígeno de interés. Esto lleva a que las células que presentan antígeno situadas en la sangre activen tanto células T específicas de antígeno de la sangre como también del tejido y causen una inducción de citocinas específica, por medio de las cuales se pueden identificar las células T específicas de antígeno. La característica particular del nuevo método analítico es en este caso, que las células aisladas de tejido se tiñan con un anticuerpo CD45 acoplado con un fluorocromo, antes de que sean mezcladas con las células sanguíneas. Esto lleva a que se puedan discriminar con el análisis definitivo células T de la sangre y células T del tejido a causa de la falta o de la existencia de esta señal fluorescente, aunque las células se mezclen entre sí durante el tratamiento. A través de la estimulación simultánea resulta una prueba mejorada de una señal, que no se detecta o se detecta peor mediante la estimulación exclusiva del tejido de células T. La sangre total provee en consecuencia el entorno fisiológico necesario para la estimulación e inducción de una respuesta celular T, que no es óptima en la estimulación única de las células tisulares aisladas. En 4 y 5 se divulga igualmente el método para la detección de células inmunitarias específicas de antígeno aisladas de tejidos.

[0004] A través de la invención se puede resolver el problema técnico de que aunque hasta ahora se pueden identificar las células T que infiltran el tejido, sin embargo no es posible o es difícil detectar su especificidad de antígeno particularmente con el número de células bajo. El nuevo procedimiento de prueba permite por lo tanto un análisis cualitativo y cuantitativo más sensible de células T específicas de antígeno de tejidos, que como procedimiento de detección diagnóstico y para la monitorización del éxito del tratamiento podría encontrar aplicación en enfermedades de órganos específicas de patógenos, pero también determinadas por células T dirigidas contra antígenos tumorales, autoantígenos o aloantígenos. Además, esta invención técnica permite la posibilidad de cuantificación simultánea y análisis de células T específicas de antígeno de tejido y sangre, y ofrece así la posibilidad de determinar en una única reacción de estimulación desplazamientos de células T específicas de antígeno en el tejido en comparación con la sangre. Por lo tanto, este procedimiento de prueba puede contribuir decisivamente al diagnóstico en pacientes con infecciones, enfermedades autoinmunitarias, tras el trasplante de órganos o en tumores.

Palabras clave

[0005] Inmunidad celular, infección viral, células inmunitarias que infiltran el tejido, linfocitos que infiltran el tumor, sangre total, inmunodiagnóstico, enfermedades autoinmunitarias, enfermedad tumoral

Bibliografía no patentada citada

[0006]

1. Protti, M.P., Monte, L.D., and Lullo, G.D. 2014. Tumor antigen-specific CD4+ T cells in cancer immunity: from antigen identification to tumor prognosis and development of therapeutic strategies. *Tissue Antigens* 83:237-246.
2. Schmidt, T., and Sester, M. 2013. Detection of antigen-specific T cells based on intracellular cytokine staining using flow-cytometry. *Methods Mol Biol* 1064:267-274.
3. Letsch, A., and Scheibenbogen, C. 2003. Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. *Methods* 31:143-149.
4. Perret, R. et al. 2014. Analysis of Tumor-infiltrating Lymphocytes Following CD45 Enrichment. *Bio-Protocol* 4(16):1-9.
5. El-Houseini et al. 2008. Isolation and Immuno-Phenotypic Characterization of Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) Obtained from Breast Malignant Tumor Tissues of Egyptian Patients. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* 20(4):379-386.

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección mejorada de células inmunitarias específicas de antígeno aisladas de tejidos, que consiste en los siguientes pasos de procedimiento:

- aislamiento de las células inmunitarias vitales de tejido por técnicas de preparación adecuadas, por ejemplo por extracción enzimática o mecánica,
- determinación del número total de células, por ejemplo se necesitan por cada preparación de estimulación 10^4 hasta $1,5 \times 10^6$ células,
- tinción previa de las células inmunitarias aisladas con un anticuerpo acoplado a un fluorocromo, que está orientado contra antígenos expresados en las células, p.ej. CD45 o mediante fluorocromos idóneos para la coloración de células vitales, p.ej. carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster, CFDA-SE,
- separación de anticuerpos o fluorocromo no unido a través de los pasos de lavado,
- mezcla de las células inmunitarias teñidas previamente con sangre total heparinizada de la misma persona,
- estimulación de las muestras mezcladas con el antígeno interesante, con o sin la adición de anticuerpos coestimuladores anti-CD49d y anti-CD28; solamente anti-CD49d o solamente anti-CD28,
- incubación durante 30min a 4h a 35 hasta 39°C y 3 hasta 10% de CO₂,
- adición de un inhibidor de la secreción, p.ej. Brefeldina A, monensina u otro,
- incubación durante 2 hasta 12 horas a 35 hasta 39°C y 3 hasta 10% de CO₂,
- 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 por la adición de una sustancia que aumenta la permeabilidad de membrana celular, p.ej. saponina,
- incubación con anticuerpos marcados con fluorocromo específico contra marcadores de activación, p.ej. anti-CD69, de IFN de anti-IFN- γ , durante al menos 10min sobre hielo o a temperatura ambiente o a 35 hasta 39°C,
- pasos de lavado repetidos para la retirada de anticuerpos no unidos,
- análisis de las células en un citómetro de flujo y discriminación de las células inmunitarias del tejido frente a las de la sangre basadas en la señal fluorescente, que se ha usado para la tinción previa, p.ej. fluorocromo del anticuerpo-CD45, CFSE, donde las células reactivas al estímulo se distinguen de las células no reactivas en base a la positividad respecto a los marcadores de activación.

2. Método según la reivindicación 1, donde se realiza una preparación como control negativo, que es idéntico a dicha preparación de la reivindicación 1 con la excepción de la adición de antígeno y donde en vez del antígeno se lleva a cabo la adición de una cantidad correspondiente de un tampón o disolvente fisiológico, p.ej. PBS o un lisado celular no infectado o una mezcla de péptidos o de proteína no immunoestimulante a las células inmunitarias de tejido y sangre.

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

4. Método según al menos unas de las reivindicaciones 1 a 3, donde la relación de la proporción relativa de las células inmunitarias activadas por el antígeno en el tejido para la proporción relativa de las células inmunitarias activadas por el antígeno en la sangre representa una medida para la actividad inmunológica en el tejido, del cual fueron obtenidas las células inmunitarias.

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

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