



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 972**

51 Int. Cl.:
G01N 33/573 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00123141 .4**
96 Fecha de presentación : **25.10.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1122543**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2001**

54 Título: **Inmunoensayo para medulasina humana y método de diagnóstico de la esclerosis múltiple.**

30 Prioridad: **03.02.2000 JP 2000-26828**
03.02.2000 JP 2000-26829
21.04.2000 JP 2000-121587

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.03.2010

73 Titular/es: **DAINICHISEIKA COLOR & CHEMICALS**
MFG. Co. Ltd.
7-6 Bakuro-cho 1-chome
Nihonbashi, Chuo-ku, Tokyo 103-8383, JP

72 Inventor/es: **Suzuki, Hideaki;**
Takahashi, Kiyoshi;
Katsuragi, Hisashi y
Aoki, Yosuke

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 334 972 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

Inmunoensayo para medulasina humana y método de diagnóstico de la esclerosis múltiple.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para medir inmunológicamente la medulasina humana en sangre y a un método para diagnosticar la esclerosis múltiple utilizando éste. Con más detalle, se refiere a un método para medir inmunológicamente la medulasina humana en sangre que incluyen una etapa de pretratar la muestra de sangre para
10 medir con precisión el contenido en medulasina en los granulocitos en la sangre, y a un método para diagnosticar la esclerosis múltiple utilizando el contenido en medulasina en sangre.

Descripción de la técnica relacionada

15 La medulasina, que es un tipo de serina proteasa, aparece en granulocitos, etc., y se cree que desempeña muchos papeles importantes en el mecanismo de defensa, incluyendo la expresión de la inflamación, en particular la inflamación crónica. La cantidad de medulasina en los granulocitos aumenta en la etapa avanzada de una serie de enfermedades inflamatorias crónicas, y se normaliza en las etapas de remisión. Sin embargo, en pacientes que padecen esclerosis múltiple se observa que la cantidad de medulasina aumenta en gran medida unos pocos días antes de la etapa avanzada, y se normaliza antes de la remisión. La esclerosis múltiple se caracteriza por una lesión desmielinizada localizada en la materia blanca del sistema nervioso central y gliosis. Es una enfermedad inflamatoria grave que avanza con repetidas remisiones y agravamientos, y en muchos casos provoca la muerte en 10 a 15 años. La causa de la esclerosis múltiple aún no se ha identificado con claridad, pero se cree que esta enfermedad es un tipo de enfermedad autoinmunitológica en que los autoanticuerpos atacan al tejido nervioso tras la estimulación del sistema inmunológico por un virus o una bacteria. Su diagnóstico es bastante difícil y en la actualidad se realiza mediante formación de imágenes de resonancia magnética (MRI) o similares. Sin embargo, un método como MRI requiere un equipo a gran escala y conocimientos técnicos especializados para la toma de mediciones y es costoso. Además, los métodos para ensayar el líquido de la médula ósea presentan el problema de infligir un gran dolor al paciente. A la luz de estas circunstancias, ahora se ha desarrollado un método de diagnóstico sencillo mediante el cual puede realizarse el diagnóstico de la enfermedad, puede conocerse el estado de la enfermedad y pueden suponerse sus consecuencias. Como resultado, se ha realizado un estudio de métodos para medir la actividad de la medulasina en los granulocitos en sangre, y junto con el desarrollo de un método de medición inmunológica mediante el cual puede medirse con facilidad, se ha propuesto la posibilidad de diagnosticar la esclerosis múltiple según el contenido en medulasina de los granulocitos en sangre.

35 Sin embargo, se ha observado el fenómeno de que, cuando se realiza la medición después de diluir la muestra de sangre con un medio acuoso en un método para medir inmunológicamente la medulasina humana, la medición se realiza sin haber llevado a cabo un tratamiento para expulsar completamente la medulasina presente en el granulocito hacia el exterior del granulocito, y la reproducibilidad de los valores medidos no es buena y da lugar a variaciones en los valores medidos. Por consiguiente, se ha deseado el desarrollo de un método para medir inmunológicamente la cantidad de medulasina humana en sangre con una buena reproducibilidad.

45 Con respecto a la cuestión de si la esclerosis múltiple puede diagnosticarse basándose en la cantidad de medulasina en sangre, este criterio requiere la inspección de cantidades considerables de datos clínicos. Sin embargo, hasta la fecha no ha existido este tipo de datos y, además, ha sido difícil realizar un diagnóstico preciso debido a la dificultad para obtener un valor medido preciso de medulasina en los granulocitos en sangre, debido a la gran variación de los valores medidos. Por consiguiente, el diagnóstico de la esclerosis múltiple basándose en la cantidad de medulasina en la sangre ha sido difícil.

50 Además, Aoki *et al.* (1984), *Annals of Neurology*, 15, 245-249, "Medullasin Activity in Granulocytes of Patients with Multiple Sclerosis", describen un método para determinar la actividad enzimática de medulasina en granulocitos maduros que son purificados, estabilizados, sonicados y analizados.

55 Además, Aoki *et al.* (1988), *Clinica Chimica Acta*, 178, 193-204, "Enzym Immunoassay of Medullasin in Peripheral Blood", describen un método de inmunoensayo enzimático para la determinación de la cantidad de medulasina con esferas de poliestireno revestidas con IgG antimedulasina de conejo. Según Aoki *et al.*, los niveles de medulasina en la sangre periférica de pacientes con esclerosis múltiple son elevados.

Sumario de la invención

60 Comenzando a partir de Aoki *et al.* (1988), un problema técnico de la presente invención ha sido encontrar un método inmunológico mejorado para la determinación de la medulasina en sangre y un método mejorado para el diagnóstico de la esclerosis múltiple.

65 Este problema se resuelve mediante un método para medir inmunológicamente la medulasina según la reivindicación 1, y mediante un método para diagnosticar la esclerosis múltiple según la reivindicación 7.

Por consiguiente, los inventores de la presente invención han realizado investigaciones a fondo para resolver el problema descrito anteriormente. Como resultado, han descubierto que la medulasina humana en sangre puede medirse de forma precisa con una buena reproducibilidad midiendo inmunológicamente la medulasina humana utilizando anticuerpos antimedulasina humana después de romper completamente los leucocitos mediante el tratamiento de la muestra de sangre con un líquido acuoso que incluye un hemolisado o un líquido acuoso que tenga una presión osmótica específica diferente de la presión osmótica de la sangre humana.

Además, con el establecimiento de dicho método para medir de forma precisa la medulasina humana con una buena reproducibilidad, los inventores de la presente invención han advertido que el tamaño y los cambios en el contenido medido de medulasina humana en la muestra de sangre están muy relacionados con la aparición de la esclerosis múltiple y su alcance, etc. Basándose en estos descubrimiento se ha llegado a la presente invención.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para medir inmunológicamente el contenido en medulasina humana en la sangre según la reivindicación 1.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método para diagnosticar la esclerosis múltiple según la reivindicación 7.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una curva de calibración para medir la medulasina humana, preparada representando gráficamente la absorbancia medida por el inmunoensayo enzimático descrito en el ejemplo 2 como una función de la concentración del antígeno.

La figura 2 es una curva de calibración para medir la medulasina humana, preparada representando gráficamente la absorbancia medida por el inmunoensayo enzimático descrito en el ejemplo 3 como una función de la concentración del antígeno.

La figura 3 muestra los valores de medulasina humana en muestras de sangre ($\mu\text{g}/10^8$ granulocitos) representados gráficamente por separado para individuos normales, pacientes que padecen esclerosis múltiple, y pacientes que padecen enfermedades nerviosas no inflamatorias.

La figura 4 muestra los valores de medulasina humana en muestras de sangre ($\mu\text{g}/10^8$ granulocitos) representados gráficamente por separado para hombres y mujeres que padecen esclerosis múltiple.

La figura 5 muestra los valores de medulasina humana en muestras de sangre ($\mu\text{g}/10^8$ granulocitos) representados gráficamente por separado para pacientes que padecen esclerosis múltiple de diferentes edades.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

A continuación se describirá la invención con más detalle. Las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen (1) y (2) a continuación.

(1) En primer lugar, se proporciona un método para medir inmunológicamente el contenido en medulasina humana en sangre, que incluye:

(a) una etapa de romper los leucocitos en una muestra de sangre diluyendo dicha muestra de sangre con los siguientes líquidos acuosos (i) o (ii) o con una mezcla de los líquidos acuosos (i) y (ii):

(i) un líquido acuoso, que contiene 0,05% mol o más, o 0,005% mol o menos de un soluto, que tiene una presión osmótica de 250 mmol/l·H₂O (250 mOsm/kg·H₂O) o menor, o un líquido acuoso que tiene una presión osmótica de 310 mmol/l·H₂O (310 mOsm/kg·H₂O) o mayor;

(ii) un líquido acuoso, en el que dicho líquido acuoso (ii) es una disolución acuosa de un tensioactivo;

(b) una etapa de capturar la medulasina humana sobre un complejo inmunológico marcado poniendo en contacto la muestra de sangre que contiene dicha medulasina humana liberada de los leucocitos rotos en la etapa (a) con un anticuerpo monoclonal antimedulasina humana inmovilizado sobre un vehículo insoluble en presencia de un anticuerpo monoclonal antimedulasina humana marcado para formar un complejo de "sandwich" mediante una reacción de antígeno-anticuerpo;

(c) una etapa de medir la actividad del material marcador en el complejo obtenido en la etapa (b).

(2) También se proporciona un método para diagnosticar la esclerosis múltiple que incluye:

(a) una etapa de romper los leucocitos en una muestra de sangre diluyendo dicha muestra de sangre con los siguientes líquidos acuosos (i) o (ii) o con una mezcla de los líquidos acuosos (i) y (ii):

ES 2 334 972 T3

(i) un líquido acuoso, que contiene 0,05% mol o más, o 0,005% mol o menos de un soluto, que tiene una presión osmótica de 250 mmol/l·H₂O (250 mOsm/kg·H₂O) o menor, o un líquido acuoso que tiene una presión osmótica de 310 mmol/l·H₂O (310 mOsm/kg·H₂O) o mayor;

5 (ii) un líquido acuoso, en el que dicho líquido acuoso (ii) es una disolución acuosa de un tensioactivo;

(b) una etapa de capturar la medulasina humana sobre un complejo inmunológico marcado poniendo en contacto la muestra de sangre que contiene dicha medulasina humana liberada de los leucocitos rotos en la etapa (a) con un anticuerpo antimedulasina humana inmovilizado sobre un vehículo insoluble en presencia de un anticuerpo antimedulasina humana marcado para formar un complejo de "sandwich" mediante una reacción de antígeno-anticuerpo;

(c) una etapa de medir la actividad del material marcador en el complejo obtenido en la etapa (b);

15 (d) una etapa de observar el tamaño y/o los cambios en el contenido de medulasina humana en la muestra de sangre obtenidos a partir de los valores para la cantidad de material marcador obtenidos en la etapa (c); y

(e) diagnosticar la aparición y/o el alcance de la esclerosis múltiple a partir de la observación de los resultados obtenidos en la etapa (d).

20 La mayoría de la medulasina humana en la muestra de sangre que se va a medir en la presente invención aparece dentro de los granulocitos, que son un componente de los leucocitos existentes en la sangre y, por tanto, romper completamente los granulocitos para liberar toda la medulasina hacia el exterior de la membrana celular antes de la medición es un requisito fundamental para obtener mediciones precisas. Por consiguiente, si este requisito no se cumple totalmente existirán grandes variaciones en las mediciones y sólo pueden obtenerse datos medidos con una

25 baja reproducibilidad.

Los métodos en que puede pensarse para romper completamente los leucocitos en la muestra de sangre son métodos mecánicos, métodos que emplean ondas de ultrasonido y métodos que implican congelación y descongelación repetidas. Sin embargo, los inventores de la presente invención han descubierto, como resultado de amplias investigaciones, que el siguiente método es muy eficaz como método práctico que produce mediciones de gran precisión y que puede llevarse a cabo con relativa facilidad comparado con los métodos mencionados anteriormente.

(1) En primer lugar, un método para tratar una muestra de sangre con un líquido acuoso que tiene una presión osmótica diferente de la de la sangre; y

35 (2) en segundo lugar, un método para tratar una muestra de sangre con un líquido acuoso que comprende un hemolisado que es un producto farmacéutico con el que puede romperse la membrana celular de los granulocitos bajo condiciones suaves.

40 La presión osmótica de la sangre humana está en el intervalo de aproximadamente 280 a 290 mmol/l·H₂O (280 a 290 mOsm/kg·H₂O) y, por tanto, resulta difícil, por ejemplo, romper completamente los granulocitos en la sangre utilizando un líquido acuoso que tenga una presión osmótica de 250 a 310 mmol/l·H₂O (250 a 310 mOsm/kg·H₂O).

45 Por consiguiente, la ruptura completa de los granulocitos en sangre humana puede lograrse diluyendo la sangre con un líquido acuoso que tenga una presión osmótica menor que 250 mmol/l·H₂O (250 mOsm/kg·H₂O), o un líquido acuoso que tenga una presión osmótica mayor que 310 mmol/l·H₂O (310 mOsm/kg·H₂O).

Los líquidos acuosos de este tipo que pueden utilizarse incluyen agua pura que puede incluir disolventes orgánicos solubles en agua, y disoluciones acuosas y disoluciones tampón que sean líquidos acuosos que tengan una concentración extremadamente alta o una concentración extremadamente baja de un soluto que consiste en una sustancia soluble en agua, como sales de ácidos inorgánicos, sales de ácidos orgánicos, azúcares, alcoholes de azúcares, aminoácidos y proteínas, y que tengan una presión osmótica que pueda romper completamente los granulocitos. De forma específica, el cloruro de sodio, los fosfatos de sodio, etc., son sales de ácidos inorgánicos preferidas, y el acetato de sodio, el citrato de sodio, etc., son sales de ácidos orgánicos preferidas. Además, la glucosa y el sorbitol, etc., son los azúcares y los alcoholes de azúcares preferidos. Las disoluciones acuosas que tienen una concentración extremadamente alta del soluto descrito anteriormente contienen 0,05% mol o más, preferiblemente 0,1% mol o más del soluto, mientras que las disoluciones acuosas que tienen una concentración extremadamente baja del soluto descrito anteriormente contienen 0,005% mol o menos, preferiblemente 0,001% mol o menos. La cantidad del líquido acuoso utilizado es de 50 a 100.000 veces la de la muestra de sangre, en términos de unidades de volumen, preferiblemente de 100 a 10.000 veces, y más preferiblemente de 500 a 2000 veces.

Además, el método para tratar la muestra de sangre con un medio acuoso que incluya el hemolisado mencionado anteriormente también se prefiere. Los ejemplos específicos no limitantes de hemolisados son tensioactivos catiónicos, como sales de ácido graso superior, arilsulfonatos de alquilo, sulfonatos de alquilo y ésteres de ácido alquilsulfónico; tensioactivos aniónicos, como sales de alquilpiridinio, sales de alquiltrimetilamonio, y alquilpolioxietilaminas; tensioactivos no iónicos, como polioxietilén alquilfenil éteres, polioxietilén alquil éteres y ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán; tensioactivos anfóteros, como alquilbetaínas; tensioactivos naturales, como saponina, lecitina

ES 2 334 972 T3

y ácido cólico; y biocomponentes, como complementos y veneno de serpiente, toxina de abeja y una enzima como proteasa. Estos hemolisados pueden utilizarse en forma de un líquido acuoso que tenga del 0,0001% al 10% en peso, preferiblemente del 0,001% al 5% en peso, y preferiblemente en particular del 0,005% al 1% en peso. El medio líquido acuoso puede ser, por ejemplo, agua o un medio mixto que comprenda agua y un disolvente orgánico soluble en agua. La cantidad del líquido acuoso utilizado es de 50 a 100000 veces, preferiblemente de 100 a 10000 veces, y más preferiblemente de 500 a 2000 veces la de la muestra de sangre en términos de unidades de volumen.

El método inmunológico de medir la medulasina humana se realiza con la muestra de sangre líquida diluida acuosa obtenida mediante el tratamiento de una muestra de sangre con el líquido acuoso (i) o el líquido acuoso (ii) descritos anteriormente, y en que los granulocitos se han roto completamente. El método comprende una etapa de reacción inmunológica en que la muestra para la medición se pone en contacto con un anticuerpo antimedulasina humana en presencia de un antígeno o un anticuerpo marcados para capturar la medulasina humana como un complejo inmunológico marcado, a través de una reacción de antígeno-anticuerpo; y una etapa de detección, en que el complejo inmunológico producido de esta manera se mide utilizando el material marcador presente en su molécula. Cualquier método puede utilizarse para la reacción de antígeno-anticuerpo en la etapa de reacción inmunológica.

Los ejemplos no limitantes de los métodos que pueden utilizarse incluyen:

(1) un método de "sandwich" en que un anticuerpo marcado se hace reaccionar con el antígeno en la muestra de sangre que se va a medir, después de capturarlos con un anticuerpo inmovilizado sobre un vehículo insoluble;

(2) un método de dos anticuerpos en que se emplea un anticuerpo derivado de un animal, diferente del anticuerpo inmovilizado sobre el vehículo insoluble en el método de "sandwich", y en que un segundo anticuerpo marcado con respecto a este anticuerpo también se hace reaccionar con el complejo de "sandwich" producido;

(3) un método de competición en que el antígeno en la muestra de sangre que se va a medir se hace reaccionar con un anticuerpo inmovilizado sobre un vehículo insoluble en presencia de un antígeno marcado con la enzima peroxidasa;

(4) un método de aglutinación-precipitación en que la muestra de sangre que incluye el antígeno que se va a medir se trata con un anticuerpo marcado que reacciona específicamente con éste para producir una aglutinación-precipitación, y después se detecta el material marcador en el complejo inmunológico separado mediante separación con centrifugación; y

(5) un método de biotina-avidina en que una avidina marcada se hace reaccionar con un anticuerpo marcado con biotina.

Cuando se emplea un vehículo insoluble en el método de medir inmunológicamente la medulasina humana según la presente invención, los ejemplos de este vehículo insoluble incluyen compuestos poliméricos como poliestireno, polietileno, polipropileno, poliéster, poliacrilonitrilo, resinas de flúor, dextrano reticulado, y polisacáridos, así como vidrio, metales, partículas magnéticas y combinaciones de éstos. El vehículo insoluble puede utilizarse, por ejemplo, en diversas formas, como bandejas, esferas, fibras, varillas, discos, recipientes, células, microplacas y tubos de ensayo. Puede utilizarse cualquier método para inmovilizar los antígenos o los anticuerpos a estos vehículos insolubles. Por ejemplo, pueden utilizarse métodos de adsorción física, métodos de unión covalente y métodos de unión iónica.

Pueden emplearse anticuerpos de cualquier clase de inmunoglobulinas en el método para medir inmunológicamente la medulasina humana según la presente invención, pero el uso de anticuerpos de clase IgG se prefiere. Es posible utilizar anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales, pero se prefieren los anticuerpos monoclonales. Éstos pueden utilizarse, por ejemplo, en forma de un anticuerpo entero o como fragmentos, como $F(ab')_2$ y Fab. Los anticuerpos pueden obtenerse a partir de cualquier fuente, pero el uso de anticuerpos derivados de ratones, ratas, conejos, vacas, cabras, pollos, etc. se prefiere.

Después, es preferible utilizar enzimas, sustratos fluorescentes, sustancias luminiscentes y sustancias radiactivas, etc. como material marcador para la medición en la etapa de detectar el complejo inmunológico marcado de medulasina humana capturada de esta manera. Los ejemplos no limitantes incluyen enzimas, como peroxidasa, fosfatasa alcalina, y β -D-galactosidasa; sustancias fluorescentes, como isocianato de fluoresceína y ficobiliproteínas; sustancias luminiscentes, como luminóles, diojetanos y sales de acridinio; y sustancias radiactivas, como ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Cuando se emplea una enzima como material marcador, se emplea un sustrato y, si se requiere, un agente colorante, un agente fluorescente o un agente luminiscente para medir su actividad. Si se emplea la peroxidasa como enzima puede utilizarse peróxido de hidrógeno, etc. como sustrato, sal de amonio del ácido 2,2'-azinodi[3-etilbenzotiazolinsulfónico] (ABTS), ácido 5-aminosalicílico, o-fenilendiamina, 4-aminoantipirina, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, etc. como agente colorante, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico, etc. como agente fluorescente, y luminóles, complejos de transporte de carga de lucigenina como agente luminiscente (por ejemplo, se hace referencia a la publicación internacional n° WO00/09626). Además, si se emplea la fosfatasa alcalina como enzima, puede utilizarse 4-nitrofenilfosfato, 4-metilumbeliferilfosfato, cortisol-21-fosfato, etc. como sustrato; si se emplea β -D-galactosidasa como enzima, puede utilizarse 2-nitrofenil- β -D-galactósido, 4-metilumbeliferil- β -D-galactósido, 3-(2'-spiroadaman-tan)-4-metoxi-4-(3''- β -D-galactosiloxifenil)-1,2-diojetano (AMPGD), etc. como sustrato.

ES 2 334 972 T3

Un anticuerpo policlonal preferido que puede utilizarse en el método para medir inmunológicamente la medulasina humana es un material separado como el componente de anticuerpo a partir de un antisuero sanguíneo antimedulasina humana obtenido mediante la inmunización de un animal según un método convencional que emplea medulasina humana como antígeno. Por ejemplo, se emplean preferiblemente anticuerpos policlonales antimedulasina humana de cabra y anticuerpos policlonales antimedulasina humana de conejo. Los anticuerpos monoclonales que pueden utilizarse en la presente invención y un método para su producción se describen en detalle en el documento JP 11151085.

Concretamente, el anticuerpo monoclonal antimedulasina humana que puede utilizarse en el método para medir inmunológicamente la medulasina humana según la presente invención se produce cultivando hibridomas en un medio de cultivo, habiéndose preparado dichos hibridomas mediante fusión celular entre células de mieloma y células productoras de anticuerpos recuperadas a partir de un animal inmunizado con medulasina humana extraída de granulocitos separados de la sangre de un individuo normal, y recuperando el anticuerpo monoclonal del cultivo, o mediante administración intraperitoneal de los hibridomas a un animal, haciendo proliferar los hibridomas en líquido ascítico, y recuperando el anticuerpo monoclonal del líquido ascítico.

Pueden producirse hibridomas productores de anticuerpos monoclonales antimedulasina humana mediante un método de fusión celular. Es decir, los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales deseados pueden obtenerse recuperando células productoras de anticuerpos de un animal inmunizado con medulasina humana, fusionando las células productoras de anticuerpos con células de mieloma, haciendo proliferar selectivamente los hibridomas obtenidos, seleccionando los hibridomas productores de anticuerpos a partir de los hibridomas obtenidos, y clonando los hibridomas seleccionados.

Los ejemplos de las células productoras de anticuerpos descritas anteriormente incluyen células de bazo, células de nodo linfático, linfocitos B y similares, que se obtienen a partir de un animal inmunizado con medulasina humana, o células o una composición que contenga medulasina humana. Los ejemplos del animal que se va a inmunizar son ratones, ratas, conejos, cabras, ovejas y caballos. La inmunización puede realizarse, por ejemplo, mediante la administración subcutánea, intramuscular o intraperitoneal de medulasina humana a un animal a una dosis de aproximadamente 1 μg a 1 mg durante 1 a 2 veces mensuales a lo largo de un periodo de 1 a 6 meses. La recolección de las células productoras de anticuerpos puede realizarse de 2 a 4 días después de la inmunización final.

Las células de mieloma pueden originarse de ratón, rata, etc. Se prefiere que las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma se deriven del mismo tipo de animal.

Puede emplearse cualquier método para fusionar las células; no existen limitaciones. Por ejemplo, puede realizarse mezclando las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma en un medio, como medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) en presencia de un acelerador de la fusión, como polietilenglicol.

Después de la operación de la fusión celular, los hibridomas pueden seleccionarse diluyendo de forma apropiada las células con DMEM, etc., centrifugando el resultado, suspendiendo el precipitado en un medio de selección, como medio HAT, y cultivando en éste las células. Entonces se seleccionan los hibridomas productores de anticuerpos mediante inmunoensayo enzimático utilizando el sobrenadante del cultivo, y el hibridoma seleccionado se clona mediante el método de dilución limitada para obtener el hibridoma productor de anticuerpos monoclonales antimedulasina humana.

El anticuerpo monoclonal puede producirse cultivando el hibridoma productor de anticuerpos obtenido de esta manera en un medio de cultivo adecuado o en un animal, y recuperando el anticuerpo monoclonal del cultivo. Con el fin de producir grandes cantidades de anticuerpo monoclonal, se prefiere el método en que los hibridomas se administran por vía intraperitoneal a un animal de la misma especie como donante de las células de mieloma, el anticuerpo monoclonal se administra en el líquido ascítico, y el anticuerpo monoclonal se recupera del líquido ascítico.

La separación del anticuerpo monoclonal del cultivo o del líquido ascítico puede realizarse mediante cromatografía con una columna de intercambiador aniónico o proteína A, G, etc. o mediante fraccionamiento con sulfato de amonio que se emplea habitualmente para la purificación de IgG.

Los anticuerpos monoclonales antimedulasina humana obtenidos de esta manera existen en forma de cuatro tipos, denominados 3F03, 3G03, 2E04 y 1G12, según el tipo de hibridoma utilizado para formarlos. La clase de inmunoglobulina de cada uno de estos anticuerpos monoclonales es IgG y la subclase es IgG₁, y cada anticuerpo reacciona específicamente con la medulasina humana, que es el correspondiente antígeno. Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales antimedulasina humana descritos anteriormente son útiles para el método para medir inmunológicamente la medulasina humana de la presente invención.

Después, el método para diagnosticar la esclerosis múltiple según la presente invención implica diagnosticar la aparición y/o el alcance o el estado de la esclerosis múltiple basándose en el tamaño o los cambios en el valor medido para el contenido en medulasina humana en la muestra de sangre obtenida mediante el método descrito anteriormente para medir inmunológicamente la medulasina humana. De forma específica, puede emplearse un método en que se

calcula la cantidad de medulasina humana en 10^8 granulocitos a partir de la concentración medida de medulasina humana en la muestra de sangre y el número medido de granulocitos en la muestra de sangre utilizando la misma muestra de sangre, y se considera la aparición de la esclerosis múltiple comparando el tamaño de este valor con un valor de corte (valor medio para un individuo normal ± 2 DE (desviación estándar)), o se consideran los cambios en el alcance de la enfermedad a lo largo del tiempo mediante la comparación de los cambios en el valor medido a lo largo del tiempo.

De 112 pacientes que padecen esclerosis múltiple que fueron diagnosticados mediante este método, 85 fueron positivos con un valor de medulasina no menor que el valor de corte, dando un alto porcentaje positivo del 75,8%. Por contraste, de 80 pacientes que padecen diversas enfermedades nerviosas no inflamatorias, el número de los que eran positivos con un valor de medulasina no menor que el valor de corte era de 13, dando un bajo porcentaje positivo de 16,3%. Por tanto, se observa que el método para diagnosticar la esclerosis múltiple según el valor de medulasina humana en la sangre es un método de diagnóstico con una fiabilidad extremadamente alta. Además, el porcentaje de individuos normales (en otras palabras, personas sanas) que arrojan un valor positivo de medulasina fue 0% (véase la tabla 5 y la figura 3). También se descubrió que el nivel del valor de medulasina para los pacientes con esclerosis múltiple no presenta diferencias entre hombres y mujeres (véase la figura 4) y no presente diferencias según la edad (véase la figura 5).

20 Ejemplos

A continuación, la presente invención se describirá en términos específicos mediante la ilustración de ejemplos, junto con ejemplos de referencia. La invención no se limita de ninguna manera a estos ejemplos. Los porcentajes indicados en los ejemplos son porcentajes en peso.

25 Ejemplo de referencia 1

Preparación de medulasina humana purificada

Se mezclaron 400 mililitros de sangre procedente de un individuo normal y disolución de dextrano al 6% (peso molecular: 200.000-300.000) en disolución salina fisiológica a una proporción de sangre:disolución de dextrano acuosa 2:1, y la mezcla resultante se agitó ligeramente con una varilla de vidrio, y después se dejó en reposo a 4-8°C durante aproximadamente 1 hora. Los eritrocitos precipitados se retiraron y el sobrenadante obtenido se centrifugó a 15.000 rpm, seguido de la recuperación del precipitado para obtener los leucocitos. A los leucocitos obtenidos se les añadió un tampón de extracción que contenía ácido etilendiaminotetraacético de sodio (EDTA) 1 mM y ácido p-cloromercuribenzoico (PCMB) 1 mM en tampón fosfato de potasio (PKB) 1 M a pH 7,0, y la mezcla resultante se incubó con agitación a 37°C durante 20 minutos. El resultado se sometió a ultrasonificación durante 15 segundos para romper completamente las células y el resultado se incubó a 37°C durante 20 minutos, seguido de una centrifugación a 4°C a 12.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se dializó contra agua destilada. El residuo precipitado se sometió varias veces a las operaciones descritas anteriormente para realizar la extracción. El fluido extraído obtenido se aplicó a una columna de gel de CM-Sepharose equilibrada con PKB 50 mM (pH 6,0) y la columna se lavó con el mismo tampón. Las sustancias adsorbidas entonces se eluyeron con PKB 1 M (pH 6,0) y la disolución eluida se dializó contra agua destilada durante la noche para eliminar la sal, seguido de la concentración del resultado con una membrana de colodión, para obtener 1,5 mg de medulasina humana purificada.

Ejemplo de referencia 2

Producción del anticuerpo monoclonal antimedulasina humana

(1) *Preparación de hibridomas mediante fusión celular entre células productoras de anticuerpos y células de mieloma*

La medulasina humana extraída y purificada a partir de granulocitos humano en el ejemplo de referencia 1 se emulsionó con adyuvante completo de Freund y el resultado se administró por vía subcutánea a ratones BALB/C de 7 semanas a una dosis de 50 μ g/ratón. Después de 4 semanas, los ratones se sometieron a otra inmunización mediante el mismo método que la primera inmunización. Siete días después de la administración adicional se confirmaron unos mayores niveles sanguíneos de anticuerpos. Otros 7 días después, el antígeno se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 50 μ g/ratón en la inmunización final. Por otra parte, células de mieloma de ratón P3-X63-Ag8-U1 (P3U1) se transfirieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de ternera fetal al 20%. Tres días después de la inmunización final, se recogieron células de bazo fusionadas de los ratones y, junto con células P3U1, utilizando polietilenglicol 4000, se colocaron en los pocillos de una microplaca de 96 pocillos. Después de la operación de fusión celular, el medio se cambió a DMEM suplementado con hipoxantina 100 μ M, aminopterina 0,4 μ M y timidina 16 μ M (medio HAT), y se obtuvieron hibridomas entre las células de bazo y las células de mieloma mediante cultivo selectivo durante 2 a 3 semanas.

ES 2 334 972 T3

(2) Selección de hibridomas productores de anticuerpos antimedulasina humana

Las valoraciones de los anticuerpos en los fluidos de cultivo de los hibridomas se determinaron mediante ELISA (ensayo inmunoabsorbente de enzimas ligados), realizando con ello la selección. Concretamente, la medulasina humana se adsorbe sobre las paredes de una microplaca para ELISA, y los pocillos se bloquearon con una disolución de albúmina de suero bovina (BSA) al 2% en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) 10 mM (pH 7,4). Se añadieron 50 microlitros del fluido de cultivo del hibridoma a cada pocillo y el resultado se dejó en reposo durante 1 hora. Después de retirar el cultivo de hibridoma y de lavar los pocillos se añadieron 100 μ l de una disolución 2 μ g/ml de anticuerpo IgG-Fc antirratón de cabra marcado con peroxidasa en PBS a cada pocillo, y la mezcla resultante se dejó reaccionar a 37°C durante 1 hora. Después de retirar la disolución de anticuerpo marcado con enzima y de lavar los pocillos se añadieron 200 μ l de una disolución de tampón citrato fosfato 0,1 M (pH 4,6) que contenía ABTS al 0,05% y peróxido de hidrógeno al 0,0034% para generar color, seleccionando con ello los hibridomas productores de anticuerpos antimedulasina humana.

(3) Clonación de células productoras de anticuerpos y preparación de anticuerpos monoclonales

Cada uno de los cultivos de los hibridomas productores de anticuerpos antimedulasina humana se sometió a clonación mediante el método de dilución limitante para obtener, por último, 4 tipos de hibridomas monoclonales. Los hibridomas se administraron por separado a ratones BALB/C por vía intraperitoneal, habiendo recibido antes dichos ratones pristano, y los hibridomas se cultivaron para obtener líquido ascítico que contenía el anticuerpo monoclonal. Después, al líquido ascítico obtenido se le añadió sulfato de amonio saturado al 50% para precipitar el anticuerpo. El precipitado se separó y se disolvió en PBS. La disolución resultante se dializó contra una disolución tampón de Tris-ácido clorhídrico 50 mM (pH 7,8) que contenía NaCl 3 M. Después se aplicó a una columna de proteína A-Sepharose CL4B (disponible en el mercado en Pharmacia). El anticuerpo adsorbido se eluyó con una disolución tampón de glicina-HCl 0,1 M (pH 5,0) y la disolución eluida se neutralizó, seguido de la purificación del anticuerpo contenido para obtener 4 tipos de anticuerpo monoclonal, 3F03, 3G03, 2E04 y 1G12.

(4) Propiedades de los anticuerpos monoclonales

30 *Análisis de la transferencia Western*

El antígeno que corresponde a los anticuerpos monoclonales se inmovilizó mediante el método de la transferencia Western.

En primer lugar, se sometió a la medulasina procedente de granulocitos humanos a una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. La proteína se trasladó desde la plancha de gel a una lámina de nitrocelulosa a lo largo de un periodo de 2 horas con una pendiente de voltaje de 7 V/cm utilizando una disolución que contenía Tris(hidroximetil)aminometano 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% añadidos a un tampón de disolución electrolítica. Después, cada carril de la lámina de nitrocelulosa se cortó y una de las láminas se sometió a tinción de proteínas con Amideblack y la otra lámina se sometió a un inmunoensayo enzimático como sigue. Concretamente, después de bloquear la lámina con BSA al 2%/PBS, se añadió el anticuerpo monoclonal antimedulasina humana de ratón como anticuerpo primario, y después se añadió un anticuerpo específico de IgG-Fc antirratón de cabra marcado con peroxidasa como anticuerpo secundario, y el resultado se dejó reaccionar. Después de lavar la lámina, se añadió una disolución de sustrato que contenía 3,3'-diaminobenzidina al 0,04% y peróxido de hidrógeno al 0,034% en PBS para generar color. Mediante esto se confirmó que los cuatro anticuerpos monoclonales antimedulasina humana de ratón reconocían a la medulasina derivada de granulocitos humanos.

Ensayo de inhibición

La medulasina humana inmovilizada sobre los pocillos de una microplaca para ELISA se hizo reaccionar con un primer anticuerpo biotinilado en presencia de un segundo anticuerpo no marcado y después se hizo reaccionar con peroxidasa conjugada con avidina, seguido de la adición de una disolución sustrato para generar color, llevando a cabo con ello un ensayo de inhibición. Con esto, no cambió la cantidad de anticuerpo biotinilado que reacciona con ninguna combinación de anticuerpos monoclonales. Por tanto, se confirmó que los 4 anticuerpos monoclonales reconocían epitopos (sitios de antígeno) que son diferentes entre sí.

Ejemplo 1

60 *Preparación de curvas de calibración para medir la medulasina humana*

(1) *Preparación de esferas que tienen anticuerpos monoclonales inmovilizados sobre ellas*

Después de lavar bien esferas de poliestireno (diámetro de 6 mm), las esferas se sumergieron un día y una noche a una temperatura de 4°C en una disolución de PBS (pH 7,4) que contenía 10 μ g/ml de anticuerpo monoclonal antimedulasina humana de ratón (2E04). Entonces se lavaron con PBS y se sometieron a un tratamiento de bloqueo dejándolas en una disolución acuosa de BSA al 1% a una temperatura de 4°C durante un día y una noche para obtener esferas que tienen anticuerpos monoclonales inmovilizados sobre ellas.

ES 2 334 972 T3

(2) Preparación de anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa

A una disolución 1,0 mg/ml de anticuerpo monoclonal antimedulasina humana de ratón (2E04) en una disolución de PBS se añadió 0,1 ml de una disolución 10 mg/ml de éster de N-(ácido m-maleimidabenzóico)-N-succinimida (MBS) en dimetilformamida y se dejó que la mezcla reaccionase a una temperatura de 25°C durante 30 minutos. Después esta disolución de mezcla de reacción se sometió a una columna cargada con Sephadex G-25 y se realizó una cromatografía de permeación en gel utilizando una disolución de tampón fosfato 0,1 M (pH 6,0) para separar el anticuerpo monoclonal unido a maleimida del MBS sin reaccionar.

Mientras, se añadió una disolución de etanol que tenía una concentración de 10 mg/ml de N-succinidimil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP) a una disolución de PBS que contenía 1,0 mg/ml de peróxidasa de rábano como enzima peroxidasa y se hizo reaccionar a una temperatura de 25°C durante 30 minutos. Después la disolución de mezcla de reacción se aplicó a una columna Sephadex G-25 y se sometió a una permeación en gel con una disolución de tampón acetato 10 mM (pH 4,5). Las fracciones que contenían HRP unida a disulfuro de piridilo se recogieron y se concentraron en aproximadamente 10 veces con enfriamiento con hielo en una bolsa de colodión. A esto se le añadió 1 ml de disolución salina fisiológica en tampón acetato 0,1 M (pH 4,5) que contenía ditiotreitól 0,1 M, seguido de una agitación durante 30 minutos a una temperatura de 25°C para reducir los grupos disulfuro de piridilo introducidos en la molécula de HRP. Esta disolución de mezcla de reacción entonces se sometió a una cromatografía de permeación en gel utilizando una columna cargada con Sephadex G-25 y se obtuvo una fracción que contenía HRP tiolada.

Después, el anticuerpo monoclonal unido a maleimida y la HRP tiolada se mezclaron y la mezcla se concentró hasta una concentración de proteína de 4 mg/ml en una bolsa de colodión con enfriamiento con hielo. Después de dejar el resultado en reposo a 4°C durante un día se sometió a una cromatografía de permeación en gel utilizando una columna cargada con Ultrogel AcA44 (fabricado por SEPRACOR) y se obtuvo un anticuerpo monoclonal marcado con enzima peroxidasa.

(3) Inmunoensayo enzimático de "sandwich" de medulasina humana

Se mezcló una esfera sobre la cual se hubo inmovilizado el anticuerpo monoclonal antimedulasina humana de ratón (3F03), 50 μ l de una disolución de PBS que contiene BSA al 2% y que también contiene medulasina humana purificada (material de referencia patrón) a una concentración de 0, 1, 10, 100 ó 200 ng/ml, y 350 μ l de una disolución de PBS que contiene BSA al 2%, y la mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos.

A continuación, después de que la disolución dentro del tubo de ensayo se hubo retirado mediante aspiración, la esfera se lavó con disolución salina fisiológica y después el tubo de ensayo se rellenó con 400 μ l de una disolución de PBS que contenía BSA al 2% y que contenía anticuerpo monoclonal antimedulasina humana de ratón marcado con HRP (2E04) a una concentración de 0,2 μ g/ml, seguido de una incubación a una temperatura de 37°C durante 30 minutos. La disolución en el tubo de ensayo se retiró mediante aspiración, seguido de un lavado con disolución salina fisiológica. Entonces se añadieron 400 μ l de una disolución de tampón ácido fosfórico 0,1 M (pH 4,6) que contenía peróxido de hidrógeno al 0,0034% y ABTS al 0,05% a cada tubo de ensayo, seguido de una incubación a 37°C durante 30 minutos. Se añadió 1 ml de una disolución de ácido oxálico acuoso 0,1 N a cada tubo de ensayo como terminador de la reacción para detener la reacción enzimática. Después se midió la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm para la disolución resultante utilizando un espectrofotómetro. Mediante la representación gráfica de la absorbancia medida con respecto a la concentración del material de referencia patrón se obtuvo una curva de calibración con una buena dependencia de la concentración, como se muestra en la figura 1.

Ejemplo 2

Medición de la medulasina en muestras clínicas mediante inmunoensayo enzimático

Muestras de sangre congelada recogida de un individuo normal (una persona sana) y de un paciente que padece esclerosis múltiple se descongelaron a temperatura ambiente y se añadieron 10 μ l de cada muestra a 2 ml de agua destilada (presión osmótica = 0 mOsm/kg·H₂O) y se mezcló de manera adecuada utilizando un mezclador Vortex para obtener disoluciones de muestra. Entonces se añadieron 10 μ l de éstas a tubos de ensayo y se diluyó mediante la adición de 390 μ l de una disolución de PBS (pH 7,4) que contenía BSA al 2%. Después, se añadieron esferas con anticuerpo monoclonal antimedulasina humana de ratón inmovilizado sobre ellas (3F03), una a cada uno de estos tubos de ensayo, y se incubó a una temperatura de 37°C durante 30 minutos. Después de la eliminación de las disoluciones en los tubos de ensayo mediante aspiración se lavaron con disolución salina fisiológica. Los tubos de ensayo entonces se rellenaron con 400 μ l de una disolución de PBS que contenía BSA al 2% y que contenía anticuerpo monoclonal antimedulasina humana de ratón marcado con HRP (2E04) a una concentración de 0,2 μ g/ml, seguido de una incubación a una temperatura de 37°C durante 30 minutos. Después se realizó un lavado, la reacción enzimática y se terminó la reacción exactamente mediante las mismas operaciones que en la preparación de las curvas de calibración descritas anteriormente. Entonces se midió la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm utilizando un espectrofotómetro, y se determinó la concentración de medulasina humana a partir de la curva de calibración. Las operaciones de medición, comenzando desde el tratamiento de dilución de la muestra, se repitieron para cada uno

ES 2 334 972 T3

5 veces para estudiar la reproducibilidad de las mediciones. Como resultado, se confirmó que la concentración de medulasina humana medida en las muestras de sangre mostró una reproducibilidad extremadamente buena, como se muestra en la tabla 1.

TABLA 1

Valores medidos para la medulasina humana en sangre

Nº de la medición	Valor medido ($\mu\text{g/ml}$)	
	Individuo normal	Paciente
1	8,2	37,2
2	8,0	35,9
3	8,2	35,5
4	7,9	36,4
5	8,2	35,8
Media	8,1	36,2
Coefficiente de variación (%)	1,7	1,8

Ejemplo comparativo 1

Medición de la medulasina en muestras clínicas mediante inmunoensayo enzimático

Muestras de sangre que se habían tomado, respectivamente, de un individuo normal y de un paciente que padece esclerosis múltiple y que se habían congelado para su conservación se descongelaron devolviéndolas a temperatura ambiente. Se tomaron $10 \mu\text{l}$ y se añadieron a 2 ml de una disolución de PBS (pH 7,4) (presión osmótica = $290 \text{ mOsm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}$) y se mezclaron de manera uniforme para obtener disoluciones de muestra. Entonces se añadieron $10 \mu\text{l}$ de éstas a tubos de ensayo y se diluyó mediante la adición de $390 \mu\text{l}$ de PBS (pH 7,4) que contenía BSA al 2%. Después, se añadieron esferas con anticuerpo monoclonal antimedulasina humana de ratón inmovilizado sobre ellas (3F03), una a cada uno de estos tubos de ensayo, y se incubó a una temperatura de 37°C durante 30 minutos. Después de la eliminación de las disoluciones en los tubos de ensayo mediante aspiración se lavaron con disolución salina fisiológica. Los tubos de ensayo entonces se rellenaron con $400 \mu\text{l}$ de una disolución de PBS que contenía BSA al 2% y que contenía anticuerpo monoclonal antimedulasina humana de ratón marcado con HRP (2E04) a una concentración de $0,2 \mu\text{g/ml}$, seguido de una incubación a una temperatura de 37°C durante 30 minutos. Después se realizó un lavado, la reacción enzimática y se terminó la reacción exactamente mediante las mismas operaciones que en la preparación de las curvas de calibración descritas anteriormente. Entonces se midió el grado de absorbancia a una longitud de onda de 420 nm utilizando un espectrofotómetro, y se determinó la concentración de medulasina humana a partir de la curva de calibración. Las operaciones de medición, comenzando desde el tratamiento de dilución de la muestra, se repitieron para cada uno 5 veces para estudiar la reproducibilidad de las mediciones. Como resultado, se confirmó que la concentración de medulasina humana medida en las muestras de sangre produjo unos datos cuya reproducibilidad no siempre puede describirse como buena, como se muestra en la tabla 2.

ES 2 334 972 T3

TABLA 2

Valores medidos para la medulasina humana en sangre

Nº de la medición	Valor medido ($\mu\text{g/ml}$)	
	Individuo normal	Paciente
1	7,8	28,8
2	6,6	25,2
3	7,1	27,0
4	5,9	21,6
5	6,9	26,3
Media	6,9	25,8
Coefficiente de variación (%)	10,1	10,4

Ejemplo 3

Medición de la medulasina en muestras clínicas mediante inmunoensayo enzimático

Muestras de sangre que se habían tomado, respectivamente, de un individuo normal y de un paciente que padece esclerosis múltiple y que se habían congelado para su conservación se descongelaron devolviéndolas a temperatura ambiente. Se tomaron $10 \mu\text{l}$ y se añadieron a 2 ml de agua destilada que contenía bromuro de dodeciltrimetilamonio al 0,01% y se mezclaron de manera adecuada utilizando un mezclador Voltex para obtener disoluciones de muestra. Entonces se añadieron $10 \mu\text{l}$ de éstas a tubos de ensayo y se diluyó mediante la adición de $40 \mu\text{l}$ de una disolución de PBS (pH 7,4) que contenía BSA al 2%. Después, se añadió una esfera con anticuerpo monoclonal antimedulasina humana de ratón inmovilizado sobre ella (3F03) y $350 \mu\text{l}$ de una disolución de PBS que contenía BSA al 2% y que contenía anticuerpo antimedulasina humana de ratón marcado con HRP (2E04) a una concentración de $0,2 \mu\text{g/ml}$ a cada tubo de ensayo, seguido de una incubación a una temperatura de 37°C durante 30 minutos. Después se realizó un lavado, la reacción enzimática y se terminó la reacción exactamente mediante las mismas operaciones que en la preparación de las curvas de calibración descritas anteriormente. Entonces se midió la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm utilizando un espectrofotómetro, y se determinó la concentración de medulasina humana a partir de la curva de calibración. Las operaciones de medición, comenzando desde el tratamiento de dilución de la muestra, se repitieron para cada uno 5 veces para estudiar la reproducibilidad de las mediciones. Como resultado, se confirmó que la concentración de medulasina humana medida en las muestras de sangre mostró una reproducibilidad extremadamente buena, como se muestra en la tabla 3.

TABLA 3

Valores medidos para la medulasina humana en sangre

Nº de la medición	Valor medido ($\mu\text{g/ml}$)	
	Individuo normal	Paciente
1	8,3	39,6
2	8,1	38,8
3	8,3	39,2
4	8,4	40,1
5	7,9	39,5

ES 2 334 972 T3

Media	8,2	39,4
Coeficiente de variación (%)	2,4	1,2

5

Ejemplo comparativo 2

10 *Medición de la medulasina en muestras clínicas mediante inmunoensayo enzimático*

Muestras de sangre que se habían tomado, respectivamente, de un individuo normal y de un paciente que padece esclerosis múltiple y que se habían congelado para su conservación se descongelaron devolviéndolas a temperatura ambiente. Se tomaron 10 μl y se añadieron a 2 ml de una disolución de PBS (pH 7,4) y se mezclaron de manera uniforme para obtener una disolución de muestra. Entonces se añadieron 10 μl de ésta a tubos de ensayo y se diluyó mediante la adición de 40 μl de una disolución de PBS (pH 7,4) que contenía BSA al 2%. Después, se añadió una esfera con anticuerpo monoclonal antimedulasina humana de ratón inmovilizado sobre ella (3F03) y 350 μl de una disolución de PBS que contenía BSA al 2% y que contenía anticuerpo monoclonal antimedulasina humana de ratón marcado con HRP (2E04) a una concentración de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ a cada tubo de ensayo, seguido de una incubación a una temperatura de 37°C durante 30 minutos. Después se realizó un lavado, la reacción enzimática y se terminó la reacción exactamente mediante las mismas operaciones que en la preparación de las curvas de calibración descritas anteriormente. Entonces se midió la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm utilizando un espectrofotómetro, y se determinaron las concentraciones de medulasina humana a partir de la curva de calibración. Las operaciones de medición, comenzando desde el tratamiento de dilución de la muestra, se repitieron para cada uno 5 veces para estudiar la reproducibilidad de las mediciones. Como resultado, se confirmó que la concentración de medulasina humana medida en las muestras de sangre produjo unos datos cuya reproducibilidad no puede describirse como buena, como se muestra en la tabla 4.

30

TABLA 4

Valores medidos para la medulasina humana en sangre

35

Nº de la medición	Valor medido ($\mu\text{g/ml}$)	
	Individuo normal	Paciente
1	7,4	25,8
2	6,8	30,4
3	6,2	32,7
4	7,6	23,9
5	5,9	29,1
Media	6,8	28,4
Coeficiente de variación (%)	10,9	12,5

50

55

Ejemplo 4

Cálculo del valor de la medulasina humana en una muestra de sangre y diagnóstico de la enfermedad

Muestras de sangre que se habían tomado, respectivamente, de un individuo normal, de un paciente que padece esclerosis múltiple, y de un paciente que padece una enfermedad nerviosa no inflamatoria y que se habían congelado para su conservación se descongelaron devolviéndolas a temperatura ambiente. Se tomaron 10 μl y se añadieron a 2 ml de agua destilada (presión osmótica = 0 mmol/l·H₂O [0 mOsm/kg·H₂O]) y se mezclaron de manera adecuada utilizando un mezclador Voltex para obtener disoluciones de muestra. Entonces se añadieron 10 μl de éstas a tubos de ensayo y se diluyó mediante la adición de 390 μl de una disolución de PBS (pH 7,4) que contenía BSA al 2%. Después, se añadió una esfera con anticuerpo monoclonal antimedulasina humana de ratón inmovilizado sobre ella (3F03) a cada tubo de ensayo, seguido de una incubación a una temperatura de 37°C durante 30 minutos. Después de la eliminación de las disoluciones en los tubos de ensayo mediante aspiración se lavaron con disolución salina

65

ES 2 334 972 T3

5 fisiológica. Los tubos de ensayo entonces se rellenaron con 400 μl de una disolución de PBS que contenía BSA al 2% y que contenía anticuerpo monoclonal antimedulasina humana de ratón marcado con HRP (2E04) a una concentración de 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, seguido de una incubación a una temperatura de 37°C durante 30 minutos. Después se realizó un lavado, la reacción enzimática y se terminó la reacción exactamente mediante las mismas operaciones que en la preparación de las curvas de calibración descritas anteriormente. Entonces se midió la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm utilizando un espectrofotómetro, y se determinaron las concentraciones de medulasina humana a partir de la curva de calibración.

10 Se calcularon los valores de medulasina humana ($\mu\text{g}/10^8$ granulocitos) que muestran la cantidad de medulasina en 10^8 granulocitos a partir de la concentración de medulasina humana y se midió el número de granulocitos utilizando cada muestra de sangre, y se muestran en la figura 3.

15 La figura 3 muestra una comparación de los valores de medulasina respectivos para individuos normales, pacientes con esclerosis múltiple, y pacientes que padecen enfermedades nerviosas no inflamatorias. Los siguientes resultados se obtienen a partir de la figura.

- Pacientes con esclerosis múltiple: 355 ± 117 (n = 112)
- Pacientes con enfermedad nerviosa no inflamatoria: 233 ± 66 (n = 80)
- Individuos normales: 213 ± 34 (n = 25)

25 Estos resultados se compararon con un valor de corte (281 $\mu\text{g}/10^8$ granulocitos) y se clasificaron como positivos o negativos. Los valores de cada uno y los porcentajes positivos se muestran en la tabla 5.

TABLA 5

Valores de la medulasina humana en muestras de sangre clínicas

Muestra	Nº de positivos	Nº de negativos	Porcentaje positivo
Pacientes con esclerosis múltiple	85	27	75,8
Pacientes con enfermedad no inflamatoria	13	67	16,3
Individuos normales	0	25	0,0

45 A partir de los anteriores resultados, se observa que el diagnóstico de la esclerosis múltiple según el valor de la medulasina en la sangre es un método de diagnóstico de alta fiabilidad. Además, los siguientes resultados se obtuvieron después de clasificar los niveles de los valores de medulasina para pacientes con esclerosis múltiple según fueran hombres o mujeres (véase la figura 4) y según sus diferentes edades (véase la figura 5).

Hombres/mujeres

- 55 - Pacientes con esclerosis múltiple:
 - Mujeres: 351 ± 107 (n = 78)
 - Hombres: 367 ± 143 (n = 34)
- 60 - Individuos normales: 214 ± 34 (n = 24)
- Valor de corte: 281 ($\mu\text{g}/10^8$ granulocitos)

ES 2 334 972 T3

Según la edad

- Pacientes con esclerosis múltiple:

- 5 · 10-19: 421 ± 154 (n = 9)
- 20-29: 329 ± 94 (n = 26)
- 30-39: 357 ± 104 (n = 30)
- 10 · 40-49: 330 ± 157 (n = 17)
- 50 y mayores: 375 ± 125 (n = 21)

15 - Individuos normales: 213 ± 34 (n = 25)

- Valor de corte: $281 (\mu\text{g}/10^8 \text{ granulocitos})$

20 Estos resultados muestran que no se observa diferencia entre hombres y mujeres y que no se observa diferencia con la edad.

Efecto de la invención

25 Con la invención, tal como se describió anteriormente, es posible medir inmunológicamente el contenido en medulasina humana en una muestra de sangre de forma precisa y con una buena reproducibilidad. Además, puede realizarse el diagnóstico de la aparición de la esclerosis múltiple, o del alcance o estado de la enfermedad, mediante un diagnóstico de sangre para detectar enfermedades inflamatorias crónicas, en particular la esclerosis múltiple, utilizando el valor medido del contenido en medulasina humana en la sangre.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 334 972 T3

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir inmunológicamente el contenido en medulasina humana en sangre, que se **caracteriza** por las siguientes etapas (a) y (b):

(a) una etapa de romper los leucocitos en una muestra de sangre, poniendo en contacto dicha muestra de sangre con los siguientes líquidos acuosos (i) o (ii) o con una mezcla de los líquidos acuosos (i) y (ii):

(i) un líquido acuoso, que contiene 0,05% mol o más, o 0,005% mol o menos de un soluto, que tiene una presión osmótica de 250 mmol/l·H₂O (250 mOsm/kg·H₂O) o menor, o un líquido acuoso que tiene una presión osmótica de 310 mmol/l·H₂O (310 mOsm/kg·H₂O) o mayor;

(ii) un líquido acuoso, en el que dicho líquido acuoso (ii) es una disolución acuosa de un tensioactivo; y

(b) determinar inmunológicamente el contenido en medulasina humana en dicha muestra de sangre mediante un método que comprende poner en contacto la muestra de sangre que contiene dicha medulasina humana liberada de los leucocitos rotos en dicha etapa (a) con un anticuerpo monoclonal antimedulasina humana inmovilizado sobre un vehículo insoluble en presencia de un anticuerpo monoclonal antimedulasina humana marcado para formar un complejo de "sandwich", y capturar la medulasina humana sobre un complejo inmunológico marcado mediante una reacción de antígeno-anticuerpo, y después determinar la cantidad de actividad del material marcador en dicho complejo.

2. El método para medir inmunológicamente el contenido en medulasina humana en sangre según la reivindicación 1, en el que dicho líquido acuoso (i) es un tampón y/o agua destilada que pueden incluir un disolvente orgánico soluble en agua.

3. El método para medir inmunológicamente el contenido en medulasina humana en sangre según la reivindicación 1, en el que dicho líquido acuoso (i) es una disolución acuosa que contiene una sustancia soluble en agua seleccionada del grupo que consiste en sustancias formadas por sales de ácidos inorgánicos, sales de ácidos orgánicos, azúcares, alcoholes de azúcares, aminoácidos y proteínas.

4. El método para medir inmunológicamente el contenido en medulasina humana en sangre según la reivindicación 1, en el que la cantidad de dicho líquido acuoso (i) utilizada es de 50 a 100000 veces la de la muestra de sangre en términos de unidades de volumen.

5. El método para medir inmunológicamente el contenido en medulasina humana en sangre según la reivindicación 1, en el que dicho líquido acuoso (ii) es una disolución acuosa de al menos un tipo de tensioactivo seleccionado del grupo que consiste en sales de ácido graso superior, sulfonatos de alquilarilo, sulfonatos de alquilo, sales de éster de sulfato de alquilo, sales de alquilpiridinio, sales de alquiltrimetilamonio, polioxietilén alquilfenil éteres, polioxietilén alquil éteres, ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán, y alquilbetaínas.

6. El método para medir inmunológicamente el contenido en medulasina humana en sangre según la reivindicación 1, en el que la cantidad de dicho líquido acuoso (ii) utilizada es de 50 a 100000 veces la de la muestra de sangre en términos de unidades de volumen.

7. Un método para diagnosticar la esclerosis múltiple, que se **caracteriza** porque incluye las siguientes etapas (a), (b) y (c):

(a) una etapa de romper los leucocitos en una muestra de sangre, poniendo en contacto dicha muestra de sangre con los siguientes líquidos acuosos (i) o (ii) o con una mezcla de los líquidos acuosos (i) y (ii):

(i) un líquido acuoso, que contiene 0,05% mol o más, o 0,005% mol o menos de un soluto, que tiene una presión osmótica de 250 mmol/l·H₂O (250 mOsm/kg·H₂O) o menor, o un líquido acuoso que tiene una presión osmótica de 310 mmol/l·H₂O (310 mOsm/kg·H₂O) o mayor;

(ii) un líquido acuoso, en el que dicho líquido acuoso (ii) es una disolución acuosa de un tensioactivo; y

(b) determinar inmunológicamente la cantidad de medulasina humana liberada hacia dicha muestra de sangre desde los leucocitos rotos en dicha etapa (a) utilizando un anticuerpo antimedulasina humana; y

(c) observar el tamaño y/o los cambios en el contenido en medulasina humana en la sangre obtenida en dicha etapa (b).

8. El método para diagnosticar la esclerosis múltiple según la reivindicación 7, en el que al menos uno de dichos anticuerpos antimedulasina humana es un anticuerpo monoclonal antimedulasina humana.

9. El método para diagnosticar la esclerosis múltiple según la reivindicación 7, en el que dicho líquido acuoso (i) es una disolución tampón y/o agua destilada que puede incluir un disolvente orgánico soluble en agua.

ES 2 334 972 T3

10. El método para diagnosticar la esclerosis múltiple según la reivindicación 7, en el que la cantidad de dicho líquido acuoso (i) utilizada es de 50 a 100000 veces la de la muestra de sangre en términos de unidades de volumen.

5 11. El método para diagnosticar la esclerosis múltiple según la reivindicación 7, en el que la cantidad de dicho líquido acuoso (ii) utilizada es de 50 a 100000 veces la de la muestra de sangre en términos de unidades de volumen.

10 12. El método para diagnosticar la esclerosis múltiple según la reivindicación 7, en el que dicha etapa (b) para determinar inmunológicamente el contenido en medulasina humana en dicha muestra de sangre comprende poner en contacto la muestra de sangre que contiene dicha medulasina humana liberada desde los leucocitos rotos en dicha etapa (a) con un anticuerpo antimedulasina humana inmovilizado sobre un vehículo insoluble en presencia de un anti-
cuerpo antimedulasina humana marcado para formar un complejo de "sandwich" mediante una reacción de antígeno-anticuerpo, y después determinar la cantidad de marcador en dicho complejo.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

Curva de calibración para la medición de la medulasina humana en una muestra de sangre

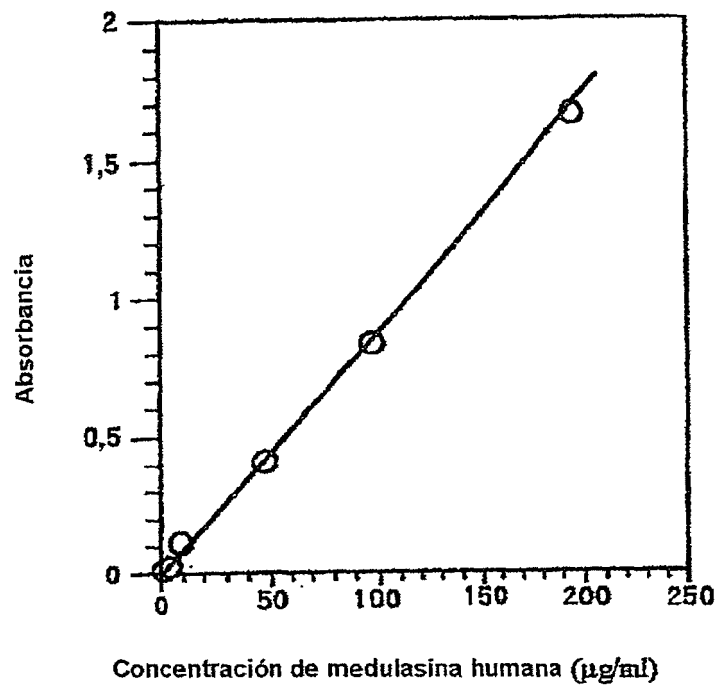


Figura 2

Curva de calibración para la medición de la medulasina humana en una muestra de sangre

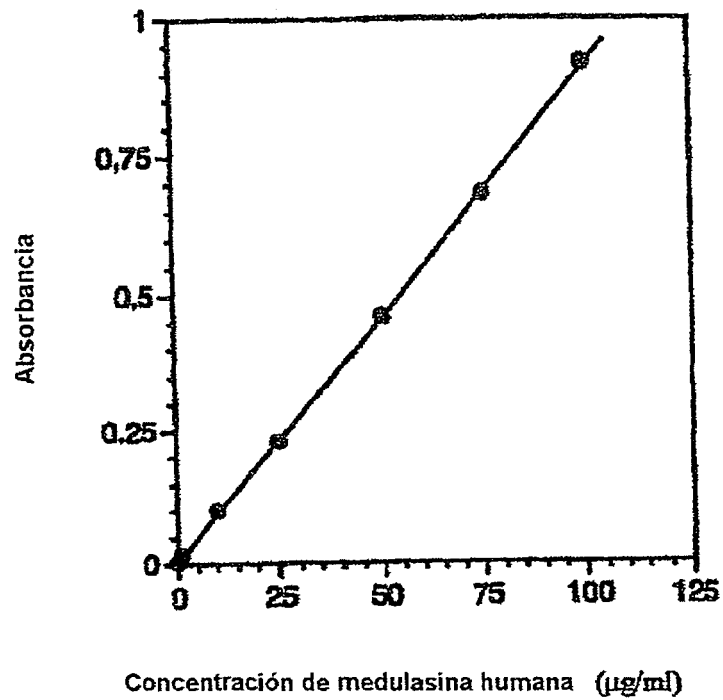
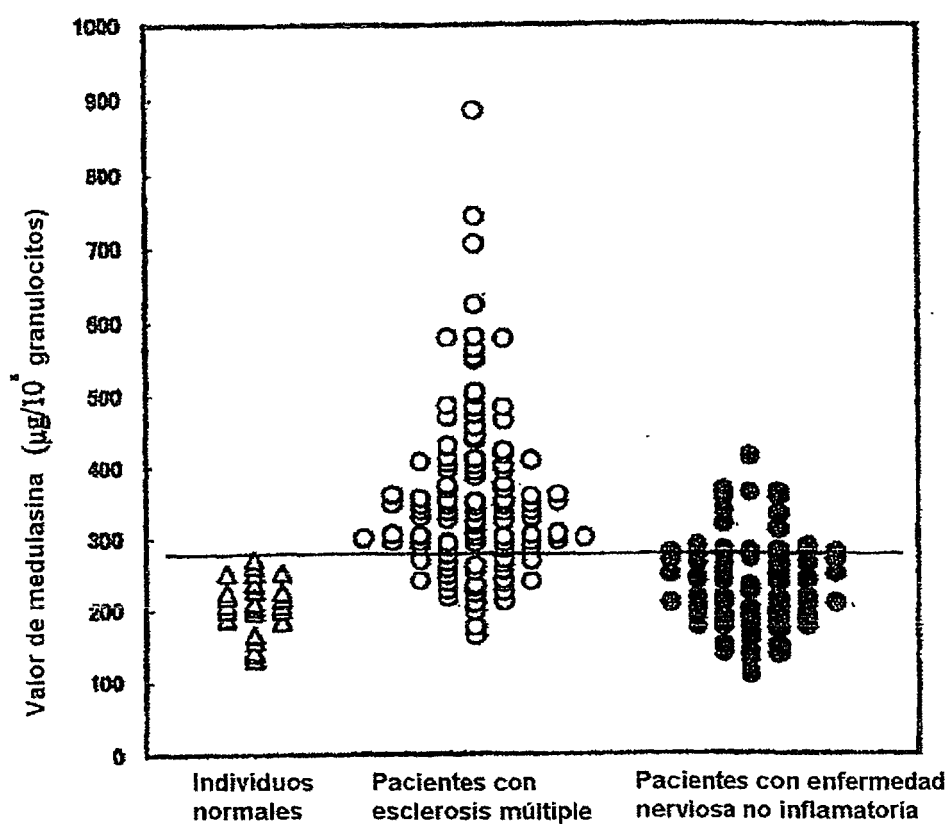


Figura 3

Comparación de los valores de medulasina para pacientes con esclerosis múltiple y pacientes con enfermedad nerviosa no inflamatoria

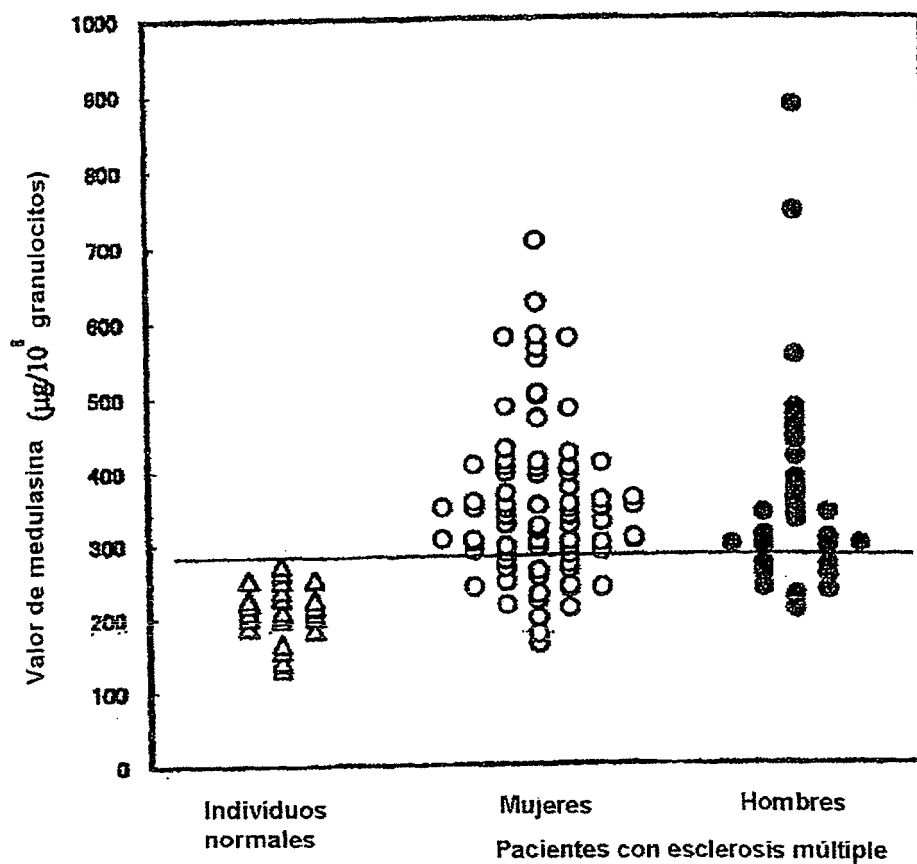


- Pacientes con esclerosis múltiple: 355 ± 117 (n=112)
- Pacientes con enferm. nerviosa no inflam.; 233 ± 66 (n=80)
- Individuos normales: 213 ± 34 (n=25)

Valor de corte = 281 (µg/10⁸ granulocitos)

Figura 4

Comparación de los valores de medulasina entre hombres y mujeres que son pacientes con esclerosis múltiple

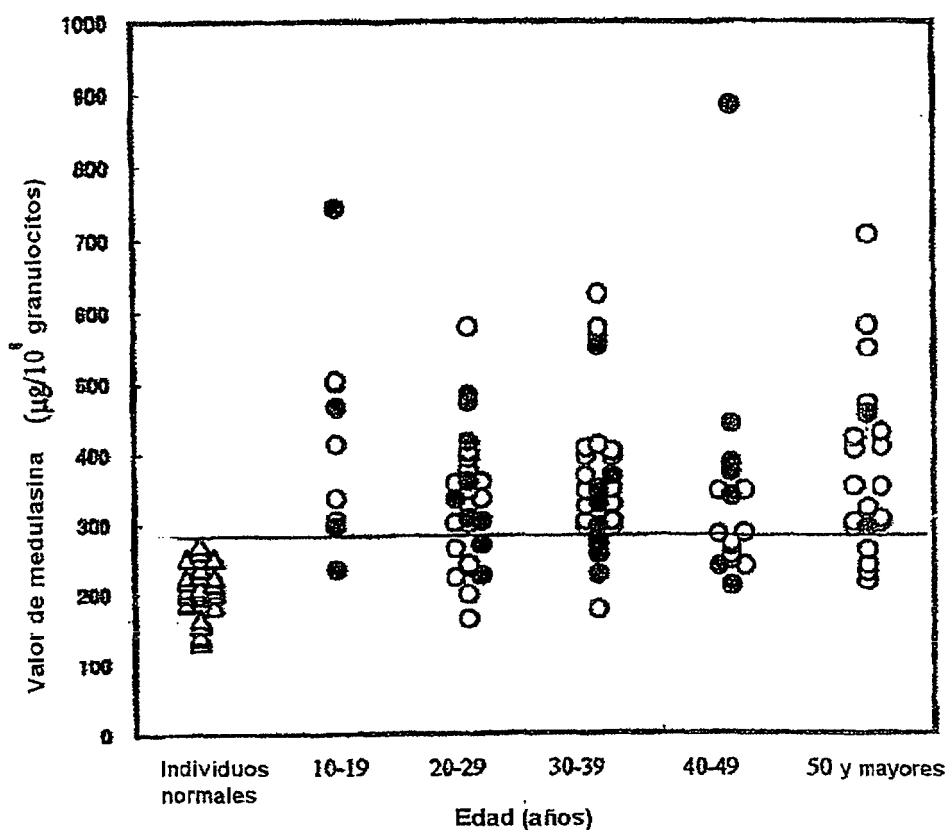


- Pacientes con esclerosis múltiple:
 - Mujeres: 351 ± 107 (n=78)
 - Hombres: 367 ± 143 (n=34)
- Individuos normales: 214 ± 34 (n=24)

Valor de corte = 281 ($\mu\text{g}/10^8$ granulocitos)

Figura 5

Comparación de los valores de medulasina para pacientes con esclerosis múltiple de diferentes grupos de edad



○ : Mujeres ● : Hombres

•Pacientes con esclerosis múltiple:

10-19:	421 ± 154 (n=9)
20-29:	329 ± 94 (n=26)
30-39:	357 ± 104 (n=30)
40-49:	330 ± 157 (n=17)
50 y mayores:	375 ± 125 (n=21)

•Individuos normales: 213 ± 34 (n=25)

Valor de corte = 281 (µg/10⁸ granulocitos)