

(11) *Número de Publicação:* **PT 93337 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

G01N033/50 A

G01N033/564 B

A61K047/48 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i>	1990.03.05	(73) <i>Titular(es):</i>	REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, THE 2199 ADDISON STREET BERKLELEY CALIFORNIA 94720 US
(30) <i>Prioridade:</i>	1989.03.06 US 319499		
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i>	1990.11.07	(72) <i>Inventor(es):</i>	KANIANTHARA GEORGE CHANDY MICHAEL DANIEL CAHALAN STEPHEN GRISSMER US US US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i>	10/96 1996.10.23	(74) <i>Mandatário(s):</i>	JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* ENSAIO PARA O TRATAMENTO E DOENÇAS AUTOIMUNITÁRIAS

(57) *Resumo:*

DIAGNÓSTICO; AUTOIMUNITÁRIO; CANAIS DE K+; ANTICORPOS

[1]g.

MEMÓRIA DESCRITIVA
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

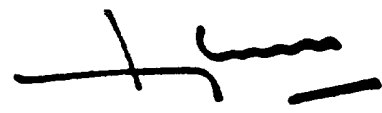
Nº 93.337

NOME: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, norte-americana, Instituição Educacional, com sede em 2199 Addison Street Berkeley, California 94720, Estados Unidos da América do Norte

EPÍGRAFE: "ENSAIO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS AUTOIMUNITÁRIAS"

INVENTORES: michael daniel Cahalan; Kanianthara George e Stephen Grissmer

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção da União de Paris de 20 de Março de 1883. Estados Unidos da América do Norte, em 6 de Março de 1989, sob o No.319,499



THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
"ENSAIO PARA E TRATAMENTO DE DOENÇAS AUTOIMUNITARIAS"

=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento relaciona-se com o diagnóstico e tratamento de doenças autoimunitárias com materiais identificados em ensaios baseados na descoberta aqui feita de que estas doenças se manifestam por números elevados de canais de K^+ do tipo 1 em células T anormais $CD4^+CD8^-$.

Os referidos ensaios compreendem essencialmente os passos de proporcionar uma cultura de células T, anormais pelo facto de apresentarem uma alteração única do canal de K^+ característica de e ligada a uma doença autoimunitária caracterizada por elevados números de canais K^+ do tipo 1; fazer contactar a referida cultura de células com um ou mais de uma bateria de materiais de teste que podem potencialmente modular os seus canais de K^+ do tipo 1; monitorizar o efeito dos referidos materiais do teste sobre os referidos canais de K^+ do tipo 1; e seleccionar candidatos a partir da bateria de materiais de teste capazes de modular os canais de K^+ do tipo 1.

Campo do Invento

O presente invento relaciona-se geralmente com progressos realizados no campo do prognóstico, diagnóstico e tratamento das doenças autoimunitárias. Mais particularmente, o presente invento é dirigido a certos ensaios para, e consequente tratamento de, doenças autoimunitárias tendo como base a identificação e caracterização aqui feita de uma alteração única do canal iónico se encontrar associada a células T anormais ligadas a essas doenças. São definidos e descritos ensaios, marcadores para prognóstico e modalidades terapêuticas para estes quadros patológicos autoimunitários.

Fundamentos do Invento

As doenças autoimunitárias têm sido objecto de vasta bibliografia devido à considerável morbilidade por elas causada em todo o mundo. As doenças autoimunitárias incluem a artrite reumatoide, a diabetes mellitus tipo-1 (dependente da insulina), a esclerose múltipla, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren, doença mixta do tecido conjuntivo, encefalomielite alérgica experimental (EAE), para indicar algumas. Tem sido e continua a ser realizada uma considerável investigação a fim de não apenas inventar um tratamento ou profilaxia contra doenças tão devastadoras, mas também estudar a(s) etiologia(s) subjacente(s) de modo a se atingir uma melhor compreensão quanto aos denominadores comuns, se é que existem, que poderiam orientar mais directamente um plano de ataque para os dominar.

Na maior parte dos casos, pensa-se que as doenças autoimunitárias resultam de células anormais do sistema imunitário que destroem tecidos alvo, quer por destruição directa quer por produção de anticorpos. Pode-se fazer uma exemplificação à

base de doenças autoimunitárias históricas. Uma dessas doenças é o chamado lupus eritematoso sistémico (SLE). No SLE, linfócitos-B anormais produzem anticorpos anti-ADN que se apresentam carregados positivamente e que se agregam nas células do rim carregadas negativamente causando inflamação e nefrite, que é sintomática do SLE. Na diabetes mellitus, células T anormais destroem sistematicamente as células dos ilheus pancreáticos levando-os a serem incapazes de produzir insulina, uma hormona necessária para um equilíbrio metabólico apropriado num organismo. Na esclerose múltipla, pensa-se que as células T anormais lesam a proteína básica da mielina, um componente importante das células nervosas, facto que leva sistematicamente à destruição de certas células nervosas, o que dá origem a uma série de sintomas neurológicos. Nas doenças autoimunitárias estudadas até à data, parece emergir um padrão comum de células sistémicas imunitárias anormais que produzem materiais que ou destroem ou retardam certos tecidos alvo causando sintomas que se manifestam para essa situação patológica.

O tratamento habitual destas doenças permanece num nível empírico e tem como base a produção de uma imunossupressão generalizada, ou com esteroides ou com outras drogas imunossupressoras. Esta técnica terapêutica acarreta também outros problemas incluindo efeitos secundários graves associados. Além disso, servem apenas para retardar a progressão natural destas doenças autoimunitárias. Um tratamento terapêutico eficaz, já para não falar de cura, encontra-se fora do alcance da técnica médica actual. As aberrações no sistema imunitário que dão origem a estas várias doenças autoimunitárias não são bem compreendidas, apesar da pesquisa exhaustiva realizada neste campo. Ver Theofilopoulos, et al., Adv. Immunol. 37, 269 (1985), por exemplo.

A pesquisa incidiu na utilização de vários modelos murinos que proporcionaram uma considerável compreensão da

patogenese dos estados patológicos, embora os síndromas clínicos e as anomalias imunológicas variem consideravelmente de estirpe para estirpe, fazendo deles estudos muito menos que perfeitos. Assim, não foi identificado um defeito subjacente comum celular ou molecular que fosse comum a todas estas doenças, caso na verdade haja sequer uma sugestão na técnica existente da sua existência.

Estudos feitos por vários investigadores demonstraram que a injeção de anticorpos contra células T $CD4^+CD8^-$ evita, e nalguns casos retarda, o início de certas doenças autoimunitárias em certos modelos murinos. Ver Theofilopoulos et al., Adv. Immunol. 37, 269 (1985); Wofsy et al., J. Exp. Med. 161, 378 (1985); Wofsy et al., J. Immunol. 136, 4554 (1986); Wofsy et al., J. Immunol. 134 852 (1985); Santoro et al., J. Exp. Med. 167, 1713 (1988); Waldor et al., Science 227, 415 (1985); Ranges et al., J. Exp. Med. 162, 1105 (1985); Christadoss et al., J. Immunol. 136, 2437 (1986); e Sriram et al., J. Immunol. 136, 4464 (1986). Este tratamento também resulta na redução de uma subpopulação de células T $CD4^+CD8^-$. Num efeito cumulativo, estes dados podem apontar para um mecanismo subjacente comum mediado por células T $CD4^+CD8^-$ e/ou células T $CD4^-CD8$. Ver Santoro, et al., J. Exp. Med. 167, 1713 (1988).

Evidência existente pode ainda sugerir razões que assistem ao papel que as células T $CD4^-CD8^-$ desempenham na indução de SLE, por exemplo. Em primeiro lugar, as células de ratinhos doentes com SLE induzem células B que segregam *in vitro* anticorpos anti-ADN patogénicos, enquanto que as mesmas células de ratinhos normais ou de ratinhos pré-autoimunes não apresentam esta propriedade. Datta, et al., J. Exp. Med. 165, 1252 (1987); Sains et al., J. Immunol. 140, 2215 (1988). Em segundo lugar, o início de SLE é grandemente acelerado nos ratinhos que apresentem

uma grave proliferação linfática dessas células devido à expressão das mutações recessivas autosômicas lpr ou gld. Ver Theofilopoulos, et al., Supra. Third, doentes com nefrite de SLE apresentam uma população expandida de células T CD4⁺ CD8⁻ no seu sangue o que induz a secreção de anticorpos. Shivakumar et al., FASEB J. 3, A492 (No. 1548) (Feb., 1989) e Datta, Federation of American Societies for Experimental Biology Summer Conference on Autoimmunity at Saxton's River, Vermont, 3-8 July, 1988. Cumulativamente, estes dados podem sugerir que as células T CD4⁺ CD8⁻ fazem de algum modo a mediação da doença autoimunitária, contribuindo para o desenvolvimento da doença. Contudo, até hoje, não foi identificado qualquer marcador ou alteração ou aberração que seja único para as células T CD4⁺ CD8⁻ anormais relacionadas com a autoimunidade.

Foi previamente referido que a expressão do canal de K⁺ na proliferação de células T CD4⁺ CD8⁻ do ratinho com mutações lpr se encontrava grandemente alterada. Chandy, et al., Science 233, 1197 (1986). Esta pesquisa resultou na associação de um padrão anormal de expressão de canal iônico com um defeito genético que predispõe ao SLE nas células do sistema imunitário, associado a proliferação linfática anormal.

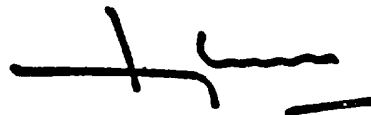
O passo seguinte consistiu em determinar se se podia observar o mesmo padrão de expressão anormal nas células do ratinho que não se apresentavam geneticamente predispostas para o SLE, como acontecia com os modelos murinos de Chandy, et al., Supra. Assim, em Grissmer, et al., Journal of Immunology 141, 1137 (1988), modelos murinos que não se apresentavam predispostos para o SLE, desenvolveram padrões de expressão anormais semelhantes associados ao início do SLE e à proliferação linfática. Assim, enquanto que em Chandy, et al., Supra, se pensou que a superexpressão anormal dos canais de K⁺ do tipo 1 em modelos

murinos com predisposição para o SLE constituia uma anomalia do sistema imunitário dependente de uma mutação lpr, em Grissmer, et al., Supra, uma proliferação semelhante dos canais de K^+ do tipo 1 em ratinhos com duas mutações lpr e gld distintas indicou que essa superexpressão se encontrava de um certo modo associada ou ao próprio SLE ou a simples sintomas de proliferação linfática. Ver também Lewis, et al., Science, 239, 771 (1988) e DeCoursey, et al., Nature 307, 465 (1984).

Theofilopoulos, et al., em Advances in Immunology 37, 269 (1985), um artigo de revisão, sugere que o perfil da doença nos modelos murinos lpr e gld não se assemelha a qualquer variante do SLE humano. Theofilopoulos, et al., sugere que é necessário um modelo correlativo claro.

Constitui assim um objectivo desta técnica realizar experiências com modelos mais representativos a fim de estabelecer se, e se for o caso como, a proliferação de células imunitárias anormais e a expressão do canal iónico se relacionam etiológicamente com as doenças autoimunitárias.

Assim, presentemente faz-se incidir a atenção sobre o próprio canal iónico. Foram identificados três tipos de canais iónicos, classificados farmacologicamente e electrofisiologicamente, os chamados tipos n, n' e 1. As células T desenvolvem-se nos tecidos linfoides periféricos, e para as presentes finalidades, são caracterizados tipos relevantes: $CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, $CD4^-CD8^-$. Pensa-se que as células $CD4^+CD8^-$ possam expressar aproximadamente 20 canais n por célula e crê-se não terem canais n' e 1. Pensa-se que as células T $CD4^-CD8^+$ tenham cerca de 20 canais n' e 1 por célula e nenhum canal n. E pensa-se que as células T $CD4^-CD8^-$ possam expressar cerca de 20 canais por célula, estando os três tipos representados. Numa resposta



imunitária normal reflectindo indução de actividade, tal como acontece com os mitogénios, os tipos de canal n são aumentados para até dez vezes nas células que são activadas. Assim, células T normais quando estimuladas pelos mitogénios, apresentam como resposta imunitária normal uma elevação no número de canais n. O bloqueio destes canais n, por exemplo com tetraetil amónio (TEA), serviria para interromper esta divisão e bloquear efectivamente uma resposta imunitária. As células T anormais podem também ser submetidas a um bloqueio semelhante. Contudo, essas células T anormais são representadas por células $CD4^-CD8^-$ duplamente negativas, manifestando uma proliferação de canais do tipo 1 que parece estar implicada na indução de quadros de doença autoimunitária. Os canais de K^+ do tipo 1 não dependem da utilização, fecham-se mais rapidamente com a repolarização do que os canais n e são muito mais sensíveis ao bloqueio, por exemplo por TEA. Constituiu o objectivo da presente pesquisa estabelecer uma ligação, se é que existe, a partir de uma etiologia entre expressão anormal do canal iónico em células imunitárias e sintomas sistémicos de doença autoimunitária.

Sumário do Invento

A experimentação limiar que estabelece a ligação atrás referida foi realizada com modelos murinos que são representativos do SLE humano, nomeadamente modelos murinos NZBx NZW, NZBxSWR, BXSB-Yaa e MRL-+/. Nestes modelos, verificou-se que no caso de SLE, como um exemplo de doença autoimunitária, o padrão único da expressão do canal de K^+ do tipo 1 em células T $CD4^-CD8^-$ foi associado com o início do SLE, em vez de ser o resultado de proliferação linfática anormal. Assim, foi estabelecida a ligação eliminando a possibilidade do que se observara em estudos anteriores ser simplesmente sintomático da doença autoimunitária linfoproliferativa.

O presente invento implica a identificação e a caracterização de uma etiologia de doenças autoimunitárias, representadas por SLE, diabetes mellitus tipo-1, encefalomielite alérgica experimental (EAE), e outras, nomeadamente, que todas essas doenças autoimunitárias demonstrem a presença de células T $CD4^-CD8^-$ anormais expressando grande número de canais do ião K^+ do tipo 1. Assim, essa expressão do canal é paralela à capacidade para induzir autoimunidade. Tendo estabelecido essa ligação como uma afirmação do presente invento, deduz-se intelectualmente que o presente invento é dirigido a vários aspectos consequentes: 1) um ensaio para o diagnóstico de doenças autoimunitárias por medição dos números relativos de canais de K^+ do tipo 1 em células T $CD4^-CD8^-$ anormais, 2) um ensaio para testar materiais extrínsecos quanto à sua capacidade para modular selectivamente os canais de K^+ do tipo 1 em células T $CD4^-CD8^-$ anormais, 3) sendo os materiais extrínsecos identificados seleccionados usados como elementos principais em regimes de drogas para tratar sistemicamente a doença autoimunitária alvo, e 4) estojos para teste associados e outras apresentações afins destes aspectos.

Assim, o presente invento relaciona-se com a identificação e a caracterização de um marcador diagnóstico para doenças autoimunitárias, o qual conduz a um alvo diagnóstico e terapêutico para essas doenças. Esta relação torna possível a identificação da etiologia de um determinado quadro patológico autoimunitário, um ensaio para detectar a presença do marcador, um ensaio para identificar moduladores (selectivos) do marcador, moduladores apropriados identificados para esse ensaio e modalidades terapêuticas baseadas nesses moduladores (drogas) e/ou anticorpos específicos criados contra os canais de K^+ do tipo 1 de células $CD4^-CD8^-$ anormais.

Assim, a quinta-essência do presente invento permite por seu lado que os números elevados de canais de K^+ do tipo 1 em células T $CD4^-CD8^-$ anormais possam ser explorados por um método de controlo dos materiais extrínsecos possuindo um efeito modulador sobre esses canais compreendendo o fornecimento de um sistema in vitro contendo elevado número de canais de K^+ do tipo 1 de células T $CD4^-CD8^-$ anormais, desafiando essas células com um ou mais materiais de teste de uma bateria desses materiais possuindo potencial putativo para modular o referido tipo de canais de K^+ do tipo 1, monitorizando o efeito dos referidos materiais de teste sobre os referidos canais de K^+ do tipo 1 e seleccionando candidatos capazes de modular os canais de K^+ do tipo 1.

O presente invento é também dirigido a um método para diagnosticar doenças autoimunitárias compreendendo o fornecimento de células T contendo canais de K^+ a partir de um teste individual, a identificação das células T anormais de entre a população ou de entre as células T fornecidas, a medição dos números relativos de canais de K^+ do tipo 1 de células anormais, e determinando se o número de canais de K^+ do tipo 1 do referido tipo é elevado em comparação com o normal.

O presente invento é adicionalmente dirigido a um método para o tratamento de doenças autoimunitárias cujos sintomas são constituídos por números elevados de canais de K^+ do tipo 1 em células T $CD4^-CD8^-$ anormais do sistema imunitário do organismo que manifesta a referida doença autoimunitária que compreende o contacto do referido organismo e/ou referido sistema celular imunitário com um material extrínseco tendo um efeito modulador sobre os referidos canais de K^+ do tipo 1, sendo esses materiais facultativamente identificados por meio de um sistema de ensaio descrito supra. Em particular, o presente invento é dirigido a um método de tratamento de doenças autoimunitárias tal

como foi atrás descrito, selectivamente sem perturbação da expressão dos canais do ião do tipo n e n' característica da resposta imunitária normal compreendendo o tratamento de um organismo ou células tal como foi atrás descrito com, por exemplo, tetraetil amónio (TEA) ou qualquer outro modulador selectivo definido e facultativamente seleccionado por meio de ensaio descrito supra.

O presente invento dirige-se ainda a estojos contendo estrutura, reagentes e meios associados para realizar o ensaio diagnóstico ou de controlo tal como foi descrito supra.

Além disso, o presente invento é dirigido aos aspectos anteriores em todas as suas apresentações associadas que serão representadas como equivalentes no âmbito da técnica dos especialistas neste campo.

O presente invento é assim dirigido à identificação, tratamento e controlo de doenças autoimunitárias, incluindo:

(1) utilização como instrumento de prognóstico, por exemplo, formando anticorpos reactivos em relação aos canais de K^+ do tipo 1 e medindo o seu número, e/ou

(2) controlo selectivo para moduladores, de preferência selectivos, dos canais de K^+ do tipo 1 para utilização diagnóstica, e/ou

(3) bloqueio, retardamento ou eliminação selectivo dos canais de K^+ do tipo 1 para utilização como agente terapêutico.

No que se refere ao atrás referido, pensa-se que se pode ligar um anticorpo reactivo com uma toxina celular de tal

modo que o anticorpo se localize e ligue a um canal de K^+ do tipo 1 de uma célula T $CD4^-CD8^-$ aberrante (responsável por uma doença autoimunitária) e assim colocar a toxina celular, por exemplo ricina, muito próxima da célula anormal alvo com consequente actividade tóxica. Fode-se usar Psoralen para reflectir as células alvo aberrantes seguindo-se activação até se obter uma citotoxina.

O presente invento é aqui ilustrado pela utilização de modelos murinos representativos da etiologia humana. Isto é evidenciado pelo facto de (1) os tipos celulares $CD4^-CD8^-$ induzirem, em todos os sistemas estudados, células anormais causando doença autoimunitária e (2) se saber que os canais de K^+ do tipo 1 existem no ser humano. Ver Shapiro *et al.*, Biophysical Journal **53**, 550a, No. W-Pos203 (1988). Pelo facto do presente invento utilizar modelos murinos, foi possível estabelecer uma ligação entre as doenças autoimunitárias e um número elevado de canais de K^+ do tipo 1 em células T anormais; assim, o presente invento é transladável para sistemas imunitários tendo células T $CD4$ e $CD8$ possuindo canais de K^+ do tipo 1, por exemplo, como se encontra no ser humano.

Descrição Detalhada do Invento

O presente invento é ilustrado usando modelos murinos característicos que estabelecem com correlação e translação apropriadas para o sistema humano, que os canais de K^+ do tipo 1 têm um número elevado de células T $CD4^-CD8^-$ anormais no início de uma determinada doença autoimunitária. Doenças autoimunitárias ilustrativas testadas foram o SLE, diabetes tipo-1, e EAE, todas com modelos murinos característicos. Porque a presente investigação se apresenta com bases tão apropriadas, dada a presente divulgação de como realizar o ensaio e de como diagnosticar e

tratar uma doença autoimunitária, qualquer especialista nesta técnica saberá como realizar essas diligências usando o sistema humano, quando seja possível actuar deste modo não embaraçado por impedimentos reguladores.

1. Descrição Breve dos Desenhos

Figura 1: expressão do canal de K^+ em ganglios esplénicos e linfáticos derivados de células T $CD4^- CD8^- Thy-1,2^+$ em ratinhos normais e ratinhos com SLE, diabetes mellitus do tipo 1, ou encefalomielite alérgica experimental (EAE; um modelo para esclerose múltipla).

Figura 2: expressão do canal de K^+ em ganglios esplénicos e linfáticos de células T $CD4^- CD8^- Thy-1,2^+$ em ratinhos com SLE jovens e velhos.

2. Definições

A expressão "material extrínseco" significa aqui qualquer entidade que não esteja habitualmente presente ou funcional no que se refere aos canais de K^+ do tipo 1 e/ou células T anormais e que afecta os mesmos. Assim, a expressão tem uma definição funcional e inclui entidades identificadas tais como hormonas; toxinas; factores do crescimento/citoquinas; substâncias moduladoras do mensageiro secundário; compostos orgânicos e compostos inorgânicos; agentes que têm impacto indirecto sobre o canal 1 através de efeitos sobre mensageiros secundários intracelulares, ou sobre o potencial de membrana ou sobre receptores; tipos celulares feitos alvo dos canais de K^+ do tipo 1 ou células T $CD4^- CD8^-$ anormais; produtos de manipulação genética tendo impacto sobre os canais 1 ou sobre as células T

CD4⁻ CD8⁻; ou materiais bacterianos ou virais que tenham impacto sobre as células T CD4⁻ CD8⁻ tendo muitos canais 1.

A expressão "efeito modulador" ou "propriedades", ou equivalentes gramaticais, significam aqui que existe um impacto tanto activo como passivo sobre os canais de K⁺ do tipo 1 e/ou células T anormais. Estes incluem, mas não se limitam a, bloqueio do canal ou da função da(s) proteína(s) do canal, redução do número de canais iónicos por célula e utilização de célula(s) ou canal(canais) secundário(s) para causar impacto sobre uma célula anormal primária.

A expressão "monitorização" no que se refere ao efeito dos materiais do teste sobre os canais de K⁺ do tipo 1 e/ou células T anormais significa aqui qualquer método conhecido ou criado para a medição do impacto de um material de teste sobre os referidos canais/células. Estes incluem, mas não se limitam a, medição da corrente, medição do potencial de membrana, medição do fluxo de K⁺, tal como com marcadores radioactivos, medindo a concentração de K⁺ e medições de consequências indirectas em relação a outros receptores, segundos mensageiros e/ou canais.

A expressão "doença autoimunitária" tem aqui um significado para além da definição clássica, e assim, incluirá qualquer quadro patológico em que as células T CD4⁻ CD8⁻ actuem como células acessórias, por exemplo, para induzir o sistema imunitário o que resulta em destruição das células do organismo.

3. Exemplos

Os exemplos que se seguem descrevem detalhadamente os materiais e métodos utilizados nos processos experimentais que se seguem:

A Figura 1 indica a condutância de K^+ máxima, g_K , de células T $CD4^-CD8^-Thy-1,2^+$ de ratinhos normais e de ratinhos com SLE ou com diabetes mellitus do tipo 1 determinado geneticamente.

Utilizou-se uma técnica "gigohm seal patch-clamp" [Hamill *et al.*, *Pflugers Arch.* 391, 85 (1981)]. As células foram separadas e coradas tal como é descrito *infra*. As condutâncias máximas de K^+ (g_K) das células T $CD4^-CD8^-Thy-1,2^+$ foram determinadas a partir da corrente de K^+ de pico máximo extraída a +40 mV (potencial de apoio -80 mV), assumindo um potencial reverso para K^+ de -80 mV. Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente (22° a 26°C). As células investigadas encontravam-se banhadas em soluto de Ringer (em mM): NaCl 160, KCl 4,5, $MgCl_2$ 2, $CaCl_2$ 1, $MgCl_2$ 2, e K-HEPES 10 (pH 7,4). A pipeta do "patch" continha KF 134, K_2 -EGTA 11, $CaCl_2$ 1,1, $MgCl_2$ 2, e K-HEPES 10 (pH 7,2). Cada ponto representa g_K numa única célula exceptuando os que têm barras que reflectem a média $\pm$ SD dos dados previamente referidos. Os dados de C3H (n=12), C3H-1pr (n=22), C3H-gld (n=26), e MRL-1pr (n=31) são colhidos de Grissmer *et al.*, *J. Immunol.* 141, 1137 (1988) e Chandy *et al.*, *Science* 233, 1197 (1986), respectivamente, e estão incluídos no gráfico para comparação. Três tipos de canais de K^+ com entrada de voltagem ($\bar{n}$, 1, $\bar{n}'$) são expressos por células T murinas, as quais se podem distinguir por critérios electrofisiológicos e farmacológicos. DeCoursey *et al.*, *J. Gen. Physiology* 89, 379 (1987).

G_K de Células T $CD4^-CD8^-$ de três ratinhos jovens MRL-+/+, antes do início da doença clinicamente sintomática e dois ratinhos velhos MRL-+/+ com nefrite de lúpus (proteinúria: >2.000 mg proteína/dl) foi determinado tal como foi anteriormente descrito em ligação com a Fig. 1. Cada ponto representa g_K numa célula simples exceptuando os que têm barras

que refletem a média $\pm$ SD dos dados referidos previamente por Grissmer *et al.*, *Science* **233**, 1197 (1986). Ver Figura 2.

As células T CD4⁻CD8⁻Thy-1,2⁺ esplénicas de ratinhos com SLE clinicamente evidente (MRL-+/+, NZBxSWR, NZBxNAW, BXSB-machos) apresentam numerosos canais de K⁺ do tipo 1/célula (Figura 1) com um g_k médio de 4550 $\pm$ 254 pS (média $\pm$ SEM, n=76). Dividindo o g_k pelas condutâncias de canal simples [Lewis *et al.*, *Science* **239**, 771 (1988)] obtem-se uma estimativa de 100-200 canais de K⁺ do tipo 1. Os dados prévios sobre a expressão do canal de K⁺ em células T CD4⁻CD8⁻Thy-1,2⁺ de C3H.lpr (g_k : 5223 $\pm$ 565 pS; média $\pm$ SEM, n=22), C3H-gld (g_k : 5092 $\pm$ 503 pS; média $\pm$ SEM, n=26), MRL-lpr (g_k : 4600 $\pm$ 600pS; média $\pm$ SEM, n=31) ratinhos [Grissmer *et al.*, *J. Immunol.* **141**, 1137 (1988) e Chandy *et al.*, *Science* **233**, 1197 (1986)], é apresentado para comparação. Ocasionalmente, foram observadas células com pequeno número de canais de K⁺ do tipo 0; estas podem representar células normais. Em contraste, células T CD4⁻CD8⁻Thy-1,2⁺ de nódulos do baço e linfáticos de ratinhos normais (C57BL, BALB/c), com idades variando entre 1-19 meses, expressam canais de K⁺ do tipo 0, 1 ou 2, com uma média baixa de g_k de 458 $\pm$ 63 pS (média $\pm$ SEM, n=39) representando cerca de 10-20 canais de k⁺/célula. Assim células T CD4⁻CD8⁻Thy-1,2⁺ de cada modelo murino para SLE, apresenta um número anormalmente elevado de canais de K⁺ do tipo 1, demonstrando a partir dos modelos de Lupus (tal como foram marcados) que a alteração se encontra ligada à doença.

Para além dos modelos de SLE murinos, a estirpe de ratinhos não obesos com diabetes (NOD) é um outro modelo murino determinado geneticamente para a doença autoimunitária [Makino *et al.*, *Exp. Amin.* **29**, 1 (1980) e Hattori *et al.*, *Science* **231**, 733 (1986)]. Estes ratinhos desenvolvem espontaneamente diabetes mellitus do tipo 1. As células T CD4⁺CD8⁻ e CD4⁻CD8⁺ foram

implicadas na patogênese desta doença [Miller *et al.*, *Nature* 307, 465 (1984), O'Neil *et al.*, *J. Immunol.* 140, 52 (1988) e Koike *et al.*, *Diabetes* 36, 539 (1987)]. O papel desempenhado pelas células T CD4⁻CD8⁻Thy-1.2⁺ não foi examinado. As células T CD4⁻CD8⁻Thy-1.2⁺ esplênicas dos ratinhos NOD com evidência clínica da diabetes mellitus do tipo 1, apresentam grande número de canais de K⁺ do tipo 1, com um g_K médio de 5795 ± 1253 pS (média $\pm$ SEM, $n=21$), reflectindo cerca de 200 canais de K⁺ do tipo 1/célula. Este padrão da expressão do canal de K⁺ é quase idêntico ao das células T CD4⁻CD8⁻Thy-1.2⁺ dos ratinhos com SLE, revelando um mecanismo comum subjacente à diabetes mellitus do tipo 1 e SLE. Uma fracção relativamente maior das células T CD4⁻CD8⁻ esplênicas (421) em ratinhos com diabetes mellitus do tipo 1, apresentou um g_K inferior ao observado em ratinhos com SLE (4/76). Esta diferença na expressão do canal de K⁺ no baço pode reflectir a natureza específica do órgão das manifestações autoimunitárias na diabetes mellitus do tipo 1, que são primariamente confinadas ao pâncreas e as manifestações autoimunitárias sistémicas no SLE.

Como o SLE e a diabetes mellitus tipo 1 murinos são doenças determinadas geneticamente, a alteração na expressão do canal de K⁺ pode estar presente desde o nascimento. Para estudar esta questão foi realizada uma comparação da expressão do canal de K⁺ em células T CD4⁻CD8⁻Thy-1.2⁺ de ratinhos MRL-+/+ jovens e velhos. As células T CD4⁻CD8⁻Thy-1.2⁺ de ratinhos MRL-+/+ jovens apresentavam uma ordem de grandeza inferior dos canais de K⁺ (g_K : 295 ± 91 pS; média $\pm$ SEM, $n=11$; ≈ 10 canais/célula) em comparação com MRL-+/+ mais velhos (g_K : 5306 ± 518 pS; média $\pm$ SEM, $n=18$; ≈ 200 canais/célula) com evidência clínica de nefrite de lupus (Figura 2). Dados mais anteriores sobre células T CD4⁻CD8⁻Thy-1.2⁺ de ratinhos C3H-1pr saudáveis jovens (g_K : 324 ± 67 pS; média $\pm$ SEM, $n=17$; ≈ 12 canais/célula) são apresentados para comparação. O modelo de expressão do canal de K⁺ em ratinhos autoimunes, antes

do início da doença clinicamente sintomática, assemelha-se ao das células T $CD4^-CD8^-Thy-1.2^+$ de ratinhos normais (comparar Figs. 1 e 2). Estes dados demonstram que a expressão do canal de K^+ anormal nas células T $CD4^-CD8^-$ é paralela ao desenvolvimento da doença e reflecte a capacidade destas células para induzirem a secreção de anticorpos anti-ADN patogénicos.

A encefalomielite alérgica experimental (EAE) é considerada como sendo um modelo para a esclerose múltipla humana. Os ratinhos inoculados com proteína básica da mielina desenvolvem paralisia no espaço de 1-2 semanas (EAE aguda). Alguns destes ratinhos recuperam e desenvolvem então uma doença reincidente crónica (EAE crónica) que se assemelha de perto à esclerose múltipla humana. Células T $CD4^-CD8^-Thy1.2^+$ esplénicas foram isoladas a partir de ratinhos com EAE crónica e foi estudada a sua expressão do canal de K^+ . Uma maior frequência de células apresentava grande número de canais de K^+ do tipo 1 em comparação com os ratinhos normais. Este modelo da expressão do canal de K^+ é semelhante ao das células $CD4^-CD8^-Thy1.2^+$ de ratinhos com SLE e com diabetes mellitus do tipo 1, revelando um mecanismo comum subjacente às três doenças autoimunitárias distintas. Uma maior fracção de células $CD4^-CD8^-Thy1.2^+$ tinha números normais de canais de K^+ /célula em comparação com ratinhos com SLE. O processo autoimunitário em EAE crónica fica primariamente confinado ao sistema nervoso e as alterações no baço não são tão evidentes como no SLE que é primariamente uma doença autoimunitária sistémica com um processo autoimunitário mais importante a ter lugar no baço.

Outros subgrupos de linfocitos T ($CD4^+CD8^-$ ou $CD4^-CD8^+$) de ratinhos machos-RXSB doentes e de ratinhos C3H-lpr, C3H-gld apresentavam números pequenos dos canais de K^+ dos tipos 1, n, ou q tal como células fenotipicamente idênticas de ratinhos normais. Células T activadas com mitogénio normal expressavam ≈ 200

canais de K^+ tipo $\bar{n}$ /célula [DeCoursey et al., *J. Gen. Physiol.* **89**, 405 (1987)], em contraste com os numerosos canais de K^+ do tipo $\bar{1}$ apresentados pelas células $CD4^+CD8^-Thy-1.2^+$ em ratinhos com SLE e diabetes mellitus do tipo 1. Estes dados demonstram que uma expressão abundante de canais de K^+ do tipo $\bar{1}$ constitui uma característica única de células T $CD4^+CD8^-$ doentes, e é diferente do modelo de expressão do canal de K^+ nas células T normais induzidas por mitogénios.

Os canais de K^+ foram identificados tendo como base as suas propriedades de inactivação, cinética de encerramento do canal, e sensibilidade ao bloqueio por tetraetilamónio (TEA^+). Os canais de K^+ do tipo $\bar{n}$ são tipicamente dependentes da utilização, isto é, apresentam inactivação cumulativa por cadências repetitivas de despolarização. A dependência da utilização foi determinada pela medição do declínio no tamanho do pico da corrente de K^+ resultante de cadências repetitivas de despolarização com a duração de 200 ms. Os canais de K^+ do tipo $\bar{n}$ também se encerram lentamente após repolarização com uma constante de tempo de cerca de 30 ms a -60 mV e são bloqueados por TEA^+ ($K_D = 8\text{mM}$). Os canais de K^+ do tipo $\bar{1}$ não são dependentes da utilização, encerram mais rapidamente por repolarização com uma constante de tempo de 2 ms a -60 mV, e são muito mais sensíveis ao bloqueio por TEA^+ ($K_D = 0,1\text{ mM}$). Os canais de K^+ do tipo $\bar{n}'$ não são dependentes da utilização, encerram lentamente tal como os canais de K^+ do tipo $\bar{n}$ após repolarização, mas são menos sensíveis ao bloqueio por TEA^+ ($K_D \approx 100\text{ mM}$).

Para as experimentações atrás referidas, os ratinhos foram alojados no Vivarium em U.C. Irvine, sendo cuidados de acordo com as regras institucionais. Os ratinhos foram ligeiramente anestesiados com metofane, e sacrificados por luxação cervical. O baço foi removido e foram preparadas suspensões

simples de células. As células foram lavadas três vezes com RPMI-1640 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) suplementadas com soro de vitelo fetal (Hyclone, Logan, Utah). As células foram suspensas de novo a 10×10^5 células/ml e as células T foram separadas das células não T por meio de uma coluna de lã de nylon. As células foram lavadas três vezes em meio, e suspensas de novo a $1-2 \times 10^5$ células/ml. As células foram coradas como se segue: As células foram em primeiro lugar incubadas em gelo durante 30 minutos com anticorpos CD4-ratinho-anti-rato e CD8-ratinho-anti-rato, lavadas três vezes em meio, incubadas durante 30 minutos em gelo com IgG-rato-anti-cabra conjugado com ficoeritrina (purificado e absorvido por afinidade para Ig de ratinho), lavadas três vezes em meio, incubadas em gelo durante 30 minutos com Thy-1.2-ratinho-anti-rato fluoresceinado, lavadas três vezes em meio, e então suspensas de novo a 2×10^6 células/ml em meio. As células foram então "patch-clamped" tal como é descrito na legenda da Fig. 1. As células T $CD4^-CD8^-Thy-1.2^+$ foram identificadas como células verdes. Outras células T ($CD4^+CD8^-Thy-1.2^+$, $CD4^-CD8^+Thy-1.2^+$) eram amarelas, e as células B e os monocitos ($CD4^-CD8^-Thy-1.2^+$) não estavam coradas.

Os ratinhos utilizados foram: C57BL: 6 e 19 meses; BALB/c: 1 e 7 meses; BXSB-machos: 2 ratinhos com 4 meses de idade; NZBxNZW: 2 ratinhos com 6 meses de idade, um com 9 meses; NZBxSWR: 3 ratinhos com 7-8 meses de idade; MRL-+/+ velhos: 2 ratinhos com mais de 20 meses de idade; ratinhos NOD: 6 e 9 meses; MRL-+/+ jovens: 6, 10 e 12 meses.

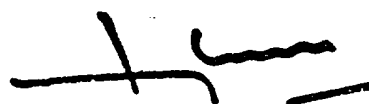
A. Ensaio para controle de drogas

1) Estudos sobre os linfocitos de ratinho

a) **Sacrifício dos ratinhos:** Os ratinhos com doenças autoimunitárias (por exemplo lupus eritematoso sistêmico ou diabetes mellitus tipo 1) foram sacrificados humanamente por luxação cervical após ligeira anestesia com metofane.

b) **Isolamento das células T a partir do baço, timo ou ganglios linfáticos:** O baço, timo e ganglios linfáticos são removidos do animal e são preparadas suspensões simples de células por esmagamento do órgão com o tubo de uma seringa através de uma malha de arame. As células são então lavadas três vezes com um meio de sustentação celular, por exemplo RPMI-1640 suplementado com soro de vitelo fetal inativado pelo calor (10%), l-glutamina (1 mM), e antibióticos apropriados (por exemplo penicilina/estreptomicina). As células são então contadas e suspensas de novo numa concentração de 10×10^6 células/ml. 50×10^6 células são então colocadas numa coluna de lã de nylon a fim de separar as células T de outras células sanguíneas tal como foi descrito previamente em Grissmer et al., J. Immunol. 41, 1137 (1988).

e) **Coloração:** As células T são incubadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 no frio durante um período de tempo apropriado (por exemplo, 20-30 minutos), lavadas no meio RPMI-1640 descrito Supra, incubadas no frio com um segundo anticorpo conjugado com corante apropriado (por exemplo, anticorpo IgG rato-anti-cabra conjugado com ficoeritrina), lavadas no meio descrito Supra, e incubadas no frio com um anticorpo específico em relação às células T conjugado com corante apropriado (por exemplo anti-receptor de Thy-1.2, ou anti-receptor de CD3, ou anti-receptor de célula T conjugado com por exemplo fluoresceína), lavadas com meio descrito Supra, e em seguida suspensas de novo a $1-5 \times 10^6$ células/ml em meio, e usadas para as experiências descritas mais abaixo. As células T $CD4^-CD8^-$ são então



identificadas sob microscopia de fluorescência como células expressando moléculas específicas da célula T tais como receptores de Thy-1.2, CD3 ou células T, e não expressando as moléculas CD4 ou CD8.

2) Estudos em outros sistemas animais

São usadas técnicas semelhantes para isolar, identificar e avaliar para exploração de acordo com este invento células T CD4⁺CD8⁻ noutros modelos animais, incluindo seres humanos, que expressam moléculas CD4 e CD8 no sistema imunitário.

3) Estudos em células humanas

a) Separação de células do sangue:

São recolhidas amostras de sangue de doentes com doenças autoimunitárias, por exemplo, lupus eritematoso sistémico. As células mononucleares são separadas do sangue num gradiente de densidades, por exemplo, Ficoll-Hypaque. As células mononucleares são lavadas com o meio descrito Supra, e as células T são isoladas quer pelo método da coluna de lã de nylon descrito Supra, ou formando rosetas com glóbulos vermelhos de sangue de carneiro tal como é descrito em Chandy et al., J. Exp. Med. 160, 369 (1984) ou por meio de qualquer outro método padrão disponível. As células T são isoladas de um modo semelhante a partir de tecidos linfóides disponíveis.

b) Coloração: As células são coradas tal como foi descrito Supra, em primeiro lugar com anti-CD4 e anti-CD8, e em seguida com segundo anticorpo conjugado com corante apropriado, por exemplo, anticorpo IgG ratinho-anti-cabra conjugado com ficoeritrina, seguindo-se um anticorpo específico em relação à célula T conjugado com um corante apropriado, por exemplo,

anti-CD3, ou anti-CD2, ou receptor anti-célula T, ou anti-Leu-2 conjugados com fluoresceína. As células T $CD4^+CD8^-$ são então identificadas sob microscopia de fluorescência como células expressando moléculas específicas da célula T tais como CD3 ou CD2 ou Leu-1 ou receptores da célula T, e não expressando as moléculas CD4 ou CD8.

4) Registos electrofisiológicos:

As células são colocadas numa câmara para registos e as células T $CD4^+CD8^-$ são identificadas apropriadamente com um microscópio invertido sob luz fluorescente, tal como foi descrito Supra. Nos casos em que a população predominante de células T é $CD4^+CD8^-$, por exemplo, em ratinhos lpr e gld ou linhagens celulares $CD4^+CD8^-$, a coloração pode não ser necessária para identificar as células. Estas células são estudadas electrofisiologicamente usando a técnica "patch-clamp" (Hamill et al., Pfluqers Arch. 391, 85 (1981)).

a) Soluções: As células sob investigação são banhadas em soluto de Ringer para mamíferos normal ($NaCl$ 160 mM, KCl 4,5 mM, $CaCl_2$ 2,0 mM, $MgCl_2$ 1,0 mM, HEPES 5 mM, ajustado para pH 7,4 com $NaOH$; 290 a 320 mosm). Podem também ser usadas outras soluções de sustentação das células. A pipeta do "patch" contém uma solução apropriada, por exemplo: KF 134 mM, EGTA 11 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 2 mM, HEPES 5 mM, ajustado para pH 7,2 com KOH ; 285 a 310 mosm).

b) Identificação dos canais de K^+ do tipo 1: Fazendo variar a voltagem através da membrana, os canais iónicos ligados a voltagem são abertos e o movimento dos iões através destes canais é medido sob a forma de corrente iónica. Foram caracterizados vários tipos distintos de canais usando uma série de

técnicas electrofisiológicas (Hille B: Ionic channels of excitable membranes, Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984). Estes canais são distinguidos à base de critérios electrofisiológicos e farmacológicos. Os canais de K^+ do tipo 1 são identificados nas células "patch-clamped" tendo como base as suas propriedades de inactivação, cinética de encerramento do canal, sensibilidade ao bloqueio por TEA^+ , amplitude simples do canal, e dependência da voltagem da activação tal como é descrito detalhadamente por DeCoursey et al., J. Gen. Physiol 89, 379 (1987).

c) Teste da droga: Depois de ter identificado os canais de K^+ do tipo 1, a solução do banho é mudada e substituída por uma solução contendo a droga de interesse. O efeito da droga sobre os canais de K^+ do tipo 1 é monitorizado electrofisiologicamente, por exemplo, alterações das propriedades de inactivação, ou cinética de encerramento do canal, ou desvio na dependência da voltagem ou activação, ou alteração da amplitude simples do canal, etc. São usados os mesmos processos para controlar uma bateria de materiais do teste sobre a mesma célula ou sobre outras células contendo canais de K^+ do tipo . A selectividade desta droga em relação aos canais de K^+ do tipo 1 é determinada testando o efeito destes materiais de teste sobre outros tipos de canais iónicos, por exemplo canais de K^+ do tipo n em células T. São identificadas as drogas que modulam os canais de K^+ do tipo 1 selectivamente e com grande potência.

d) Preparação de anticorpos contra os canais de K^+ do tipo 1: Os genes que codificam os canais de K^+ do tipo 1 são isolados por meio de técnicas padrão de ADN recombinante tais como as descritas em Weir et al., Handbook of Experimental Immunology, Vol. 3 (1986) e outros documentos disponíveis. Estes genes são usados como padrões para preparar proteínas ou peptídeos do canal de K^+ do tipo 1, que são usados como antígenos para

preparar anticorpos contra os canais de K^+ do tipo 1. Um segundo método para preparar anticorpos contra o canal de K^+ do tipo 1 é usado com células expressando grande número de canais de K^+ do tipo 1, isolando as proteínas da superfície celular destas células e usando estas proteínas como antigénios para a preparação de anticorpos. Os anticorpos são controlados quanto à sua capacidade para (a) afectar electrofisiologicamente canais de K^+ do tipo 1, tal como foi descrito Supra, ou (b) quanto à sua capacidade para destruir células expressando canais de K^+ do tipo 1, quando os anticorpos são conjugados com uma toxina celular, ou quando os anticorpos se ligam à célula na presença de complemento, ou (c) quanto à capacidade dos anticorpos ligados a radioisótopo, ou corante, ou enzima para se ligarem às células, ligação que é monitorizada por microscopia de fluorescência, por separação de células por fluorescência, por contagem radioactiva, ou por ensaios de imunoabsorvência ligada a enzima, ou por outras técnicas apropriadas.

e) Teste da droga e/ou anticorpo em doença autoimunitária: Drogas ou anticorpos identificados pelos ensaios descritos Supra como sendo selectivos para os canais de K^+ do tipo 1 são testados in vivo quanto à sua eficácia em modelos animais apropriados, por exemplo, quanto à sua capacidade para retardar o início e desenvolvimento das doenças autoimunitárias, ou doenças autoimunitárias reversas. A via de administração das drogas/anticorpos pode ser oral, parentérica, ou rectal, e a droga pode ser administrada isoladamente como elemento principal, ou em combinação com outras drogas ou anticorpos, e com intervalos regulares ou como um simples bolus, ou como uma infusão contínua em formas padrão. Drogas e anticorpos descritos Supra são também testados em ensaios in vitro, por exemplo, quanto à sua capacidade para estimular células B dos doentes autoimunes ou modelos animais para segregar autoanticorpos.

f) Um protocolo de tratamento: Drogas ou anticorpos identificados pelos ensaios atrás descritos são testados quanto à sua segurança em seres humanos pelas regras Federais. Estas drogas ou anticorpos descritos Supra são administrados por meio de formulações padrão a doentes com doenças autoimunitárias, de novo oralmente, parentéricamente, por via rectal, isoladamente ou em combinação, com intervalos regulares ou num simples bolus, ou como infusão contínua, para modulação dos canais de K^+ do tipo 1 nas células T $CD4^+CD8^-$ desse modo contrariando a sua função auxiliar acessória anormal e causando impacto na evolução da doença autoimunitária.

Todas as várias referências aqui citadas são aqui expressamente incorporadas como referência.

A descrição anterior detalha métodos específicos que podem ser usados para a prática do presente invento. Tendo detalhado métodos específicos inicialmente usados para identificar uma manifestação etiológica de doença autoimunitária, nomeadamente expressão elevada dos canais iónicos do tipo 1 em células T anormais, os especialistas nesta técnica saberão bastante bem escolher métodos alternativos de confiança para chegarem à mesma informação básica e para alargarem esta informação a outras espécies incluindo o ser humano. Assim, apesar da matéria anterior parecer detalhada no texto, esse facto não deve ser considerado como limitativo do seu âmbito total; pelo contrário, o âmbito do presente invento só pode ser determinado pela elaboração válida das reivindicações apensas.



REIVINDICAÇÕES

1. Ensaio para rastreio e identificação de materiais extrínsecos tendo um efeito modulador sobre os canais de K^+ do tipo 1 de células T anormais ligadas a uma doença autoimunitária, caracterizado por compreender os passos que se seguem:

- a) proporcionar uma cultura de células T, anormais pelo facto de apresentarem uma alteração única do canal de K^+ característica de e ligada a uma doença autoimunitária caracterizada por elevados números de canais K^+ do tipo 1,
- b) fazer contactar a referida cultura de células com um ou mais de uma bateria de materiais de teste que podem potencialmente modular os seus canais de K^+ do tipo 1,
- c) monitorizar o efeito dos referidos materiais do teste sobre os referidos canais de K^+ do tipo 1, e
- d) seleccionar candidatos a partir da bateria de materiais de teste capazes de modular os canais de K^+ do tipo 1.

2. Ensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender ainda o passo ou passos adicional(ais) a seguir ao passo d), consistindo em:

- e) utilizar o referido candidato na preparação de uma composição contendo o referido candidato como um componente essencial,



sendo a referida composição útil para desencadear as suas propriedades de modulação quando é feito contactar in vivo com as células T anormais do sistema imunitário.

3. Ensaio de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por a monitorização do passo c) ser realizada medindo a corrente eléctrica através dos canais de K^+ banhados com o referido material de teste.

4. Ensaio de acordo com a Reivindicação 5, caracterizado por a selecção do passo d) se basear no material de teste que induz corrente eléctrica pouca ou inferior ao normal através dos canais de K^+ do tipo 1.

5. Ensaio para o diagnóstico de doença autoimunitária, caracterizado por compreender os passos de:

- a) proporcionar células T contendo canais do ião K^+ a partir do teste individual,
- b) identificar células T anormais de entre a população de células T do passo a),
- c) medir os números relativos dos canais de K^+ do tipo 1 das células identificadas no passo b), e
- d) determinar se o número de canais de K^+ do tipo 1 é elevado em relação ao número normal;

em que o referido ensaio é realizado fora do corpo humano.

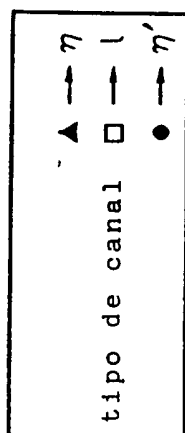
6. Ensaio de acordo com a Reivindicação 5, caracterizado por a medição do passo c) ser realizada pela medição da corrente eléctrica através dos canais de K^+ do tipo 1.

7. Ensaio de acordo com a Reivindicação 6, caracterizado por a determinação do passo d) se basear na medição da corrente eléctrica através dos canais de K^+ do tipo 1 ou pela intensidade da coloração pelo corante numa célula T normal fenotipicamente semelhante.

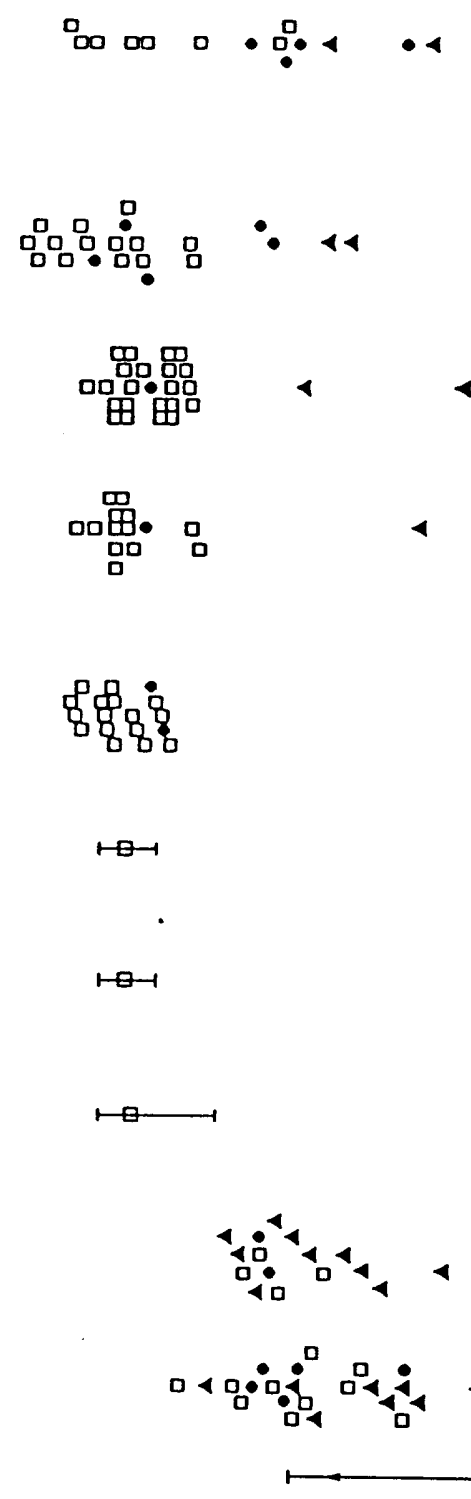
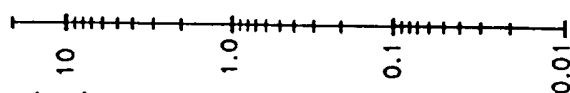
Lisboa, 5 de Março de 1990



JORGE CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 14 - 3º
1200 LISBOA



Condutância Máxima de K^+ (ns)



C3H CS7BL BALB/c

normal

MRL-lpr C3H-lpr C3H-gld BXS8-Yaa

lupus e linfoproliferação

NZBxNZW NZBxSWR

lupus

NOD

Diabetes Mellitus Tipo 1

NOD

Encefalomielite alérgica experimental (EAE)

FIG. 1

11

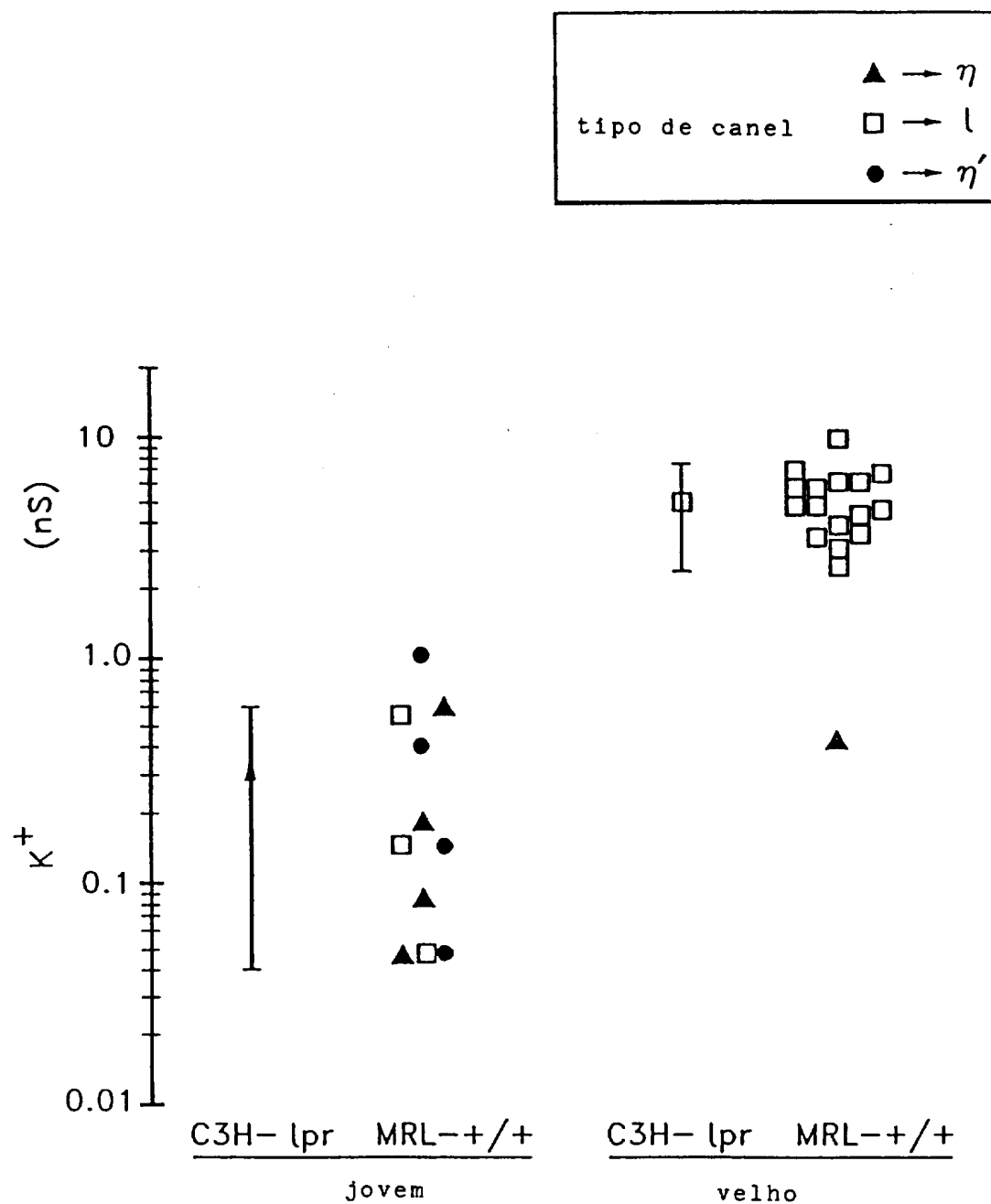


FIG. 2