(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 304 351**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **00948068 .2**
(86) Fecha de presentación : **30.06.2000**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1210604**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **05.06.2002**

(54) Título: **Procedimientos para el diagnóstico de una patología sinovial u osteoarticular.**

(30) Prioridad: **01.07.1999 FR 99 08502**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2008

(73) Titular/es: **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)**
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cédex 13, FR

(72) Inventor/es: **Delmas, Pierre;**
Garnero, Patrick y
Gineyts, Evelyne

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para el diagnóstico de una patología sinovial u osteoarticular.

La presente invención se refiere a un marcador específico de la degradación del tejido sinovial, así como a unos procedimientos que utilizan este marcador en el diagnóstico, el seguimiento y la determinación de un pronóstico de patologías sinoviales.

Las patologías osteoarticulares o patologías de las articulaciones se caracterizan por una degradación, una destrucción o una resorción de los tejidos de la articulación. Cuando aparecen los síntomas radiológicos y clínicos, la articulación ya ha experimentado modificaciones graves debidas a la implicación del cartílago y de la matriz ósea. Actualmente, se busca un marcador que detecte un estadio más precoz de las patologías osteoarticulares. En este contexto, los inventores han puesto de manifiesto el hecho de que el tejido sinovial es el primero que se degrada en ciertas patologías osteoarticulares. De esta forma, en la poliartritis reumatoide, el tejido sinovial es el primero que se degrada, empezando a degradarse a continuación el tejido cartilaginoso, y siendo el tejido óseo el último en degradarse.

La identificación de los marcadores específicos de la degradación del tejido sinovial presenta por tanto un interés primordial. Efectivamente, constituyendo el tejido sinovial uno de los primeros que se ve afectado en una patología osteoarticular, un marcador específico de la patología sinovial puede constituir por tanto un marcador precoz de la patología osteoarticular o incluso un marcador presintomático de patología osteoarticular.

Hasta ahora, no se ha descrito en la bibliografía ningún marcador sinovial específico. La invención proporciona por primera vez un marcador específico de tejido sinovial y, más particularmente, un marcador de la degradación del colágeno sinovial. La invención proporciona un marcador específico cuyo nivel refleja por sí mismo el nivel de degradación del colágeno sinovial, permitiendo de esta forma el diagnóstico o el seguimiento de la evolución de patologías sinoviales. Teniendo en cuenta que la degradación del tejido sinovial tiene lugar asimismo cuando se presentan patologías articulares, el nivel de este marcador permite asimismo el diagnóstico o el seguimiento de la evolución de las patologías osteoarticulares. Por último, como los inventores han calificado la degradación del tejido sinovial de fase precoz de patologías osteoarticulares, este marcador constituye asimismo un marcador presintomático de patologías osteoarticulares.

Preferentemente, un marcador específico de patología sinovial según la invención es la piridinolina glicosilada, y más particularmente, la piridinolina diglicosilada (Pyr-Gal-Glc) también denominada glucosil-galactosil-piridinolina o piridinolina disacarídica. Efectivamente, los presentes inventores han identificado la Pyr-Gal-Glc como un marcador específico de la degradación del colágeno sinovial.

La molécula de piridinolina es el resultado de la condensación de tres residuos hidroxilisina, uno de los cuales procede de la zona helicoidal de la molécula de colágeno (tipo mayoritario: tipo I para el tejido óseo, tipo I y III para el sinovial, tipo II para el cartílago), procediendo los otros dos de los telopéptidos terminales C y N (véase la figura 1). Los residuos de hidroxilisina pueden ser glicosilados añadiendo azúcar a nivel del grupo hidroxilo. De este modo, si la formación de piridinolina hace que intervenga un residuo hidroxilisina glicosilado, se producirá una piridinolina glicosilada (véase la figura 2c) y d)). Por el contrario, la desoxipiridinolina (véase la figura 2b)) que se forma mediante un residuo de lisina, no podrá glicosilarse, debido a la ausencia de grupos hidroxilos en la cadena lateral que comprende el grupo hidroxilo en la forma piridinolina.

Ricard-Blum *et al*., Detectable levels of pyridinoline are present in synovial fluid from various patients with knee effusion: Preliminary results. European Journal of Clinical Investigation 1995, vol 25, nº 6, 438-441, da a conocer la determinación de la presencia de piridinolina originaria del cartílago, de los huesos y de la sinovial en el líquido sinovial mediante HPLC.

La piridinolina diglicosilada se ha medido en la orina de pacientes afectados de osteoporosis (Robins SP *et al*: 3rd Int. Symp. on Osteoporosis, Copenhague, p 465, editado por C. Christiansen y K. Overgaard, 1990).

Por otra parte, se ha sugerido utilizar la piridinolina diglicosilada como un índice de la resorción del colágeno óseo y del colágeno cartilaginoso y medir a la vez la piridinolina glicosilada y la piridinolina monoglicosilada como indicador de patología artrítica (solicitud de patente nº WO 89/12824).

La invención ha demostrado que la piridinolina diglicosilada no constituía un índice de resorción del colágeno óseo o del colágeno cartilaginoso, sino un índice de la patología sinovial, y que el aumento de la piridinolina diglicosilada en los líquidos biológicos constituía un índice de patología osteoarticular, pero no de patología ósea.

En el contexto de la invención, los inventores han caracterizado el tipo de glicosilación predominante de la piridinolina en la matriz ósea, en el cartílago y en la sinovial (véanse las figuras 3 a 7). De este modo, las distintas formas de piridinolina se han investigado en el tejido óseo, cartilaginoso y sinovial en un modelo *ex-vivo* de degradación tisular.

En el contexto de la invención, se ha demostrado asimismo la existencia de las formas glicosiladas de la piridinolina en la orina, y el interés de su dosificación para el estudio de las patologías osteoarticulares tales como la poliartritis reumatoide o la artrosis. Se ha analizado, de esta forma, la variación de la proporción de cada forma de la piridinolina

y de la desoxipiridinolina (total, libre, mono o diglicosilada), en las patologías "modelos", es decir, caracterizadas o bien por un aumento específico e intenso de la remodelación ósea (enfermedad de Paget), o bien por una inflamación de la sinovial con afectación cartilaginosa (artrosis, poliartritis reumatoide). La invención ha demostrado por primera vez una relación directa entre la inflamación y degradación de la sinovial. Las piridinolinas y las desoxipiridinolinas totales se miden después de hidrólisis ácida. Las piridinolinas y las desoxipiridinolinas libres se miden después de hidrólisis alcalina para los tejidos y sin hidrólisis para los sobrenadantes. Estos resultados se resumen en las figuras 3 y 7. Estos resultados han demostrado, de este modo, que el marcador piridinolina diglicosilada (Pyr-Gal-Glc) era específico de la patología sinovial o de la degradación de la sinovial y que se correlacionaba con un marcador conocido (CartiLaps) específico de la patología del cartílago o de la degradación del cartílago (véase la figura 10).

Además, en el contexto de la invención, se ha demostrado el interés de la dosificación de las formas glicosiladas de la piridinolina y más particularmente, de la forma diglicosilada en la orina, para el seguimiento de la evolución de patologías osteoarticulares (véanse las figuras 8 y 9). De este modo, cuanto más avanzada está la patología en el individuo o más caracterizado esté por una forma grave de la patología, más se detecta el marcador Pyr-Gal-Glc en cantidades elevadas en la orina, correlativamente a lo que se puede obtener con la medición de un marcador conocido tal como el CartiLaps. Efectivamente, la cantidad de Pyr-Gal-Glc que se mide en un individuo que presenta el estadio destructivo, es más elevada que la obtenida en un individuo en el estadio no destructivo (figura 11). Además, en un individuo afectado de una patología osteoarticular, una cantidad elevada de Pyr-Gal-Glc en la orina, indica un riesgo elevado de evolución hacia un estado de destrucción rápida de las articulaciones (figura 13).

La medición de la excreción urinaria de las dos formas de glicosilación de la piridinolina, constituye unos marcadores específicos de la degradación de la matriz ósea, del cartílago y de la sinovial. La especificidad del tejido óseo, del cartílago y de la sinovial con respecto a la piel, es aportada por el núcleo piridinólico (el colágeno de tipo I de la piel forma muy pocos puentes con la piridinolina) y la especificidad tisular (sinovial, cartilaginosa, ósea) por la glicosilación y el tipo de glicosilación. Un aumento de la cantidad de piridinolina disacarídica corresponde a una elevación de la degradación del colágeno de origen sinovial, a una inflamación de la sinovial o a una proliferación del colágeno de origen sinovial; un aumento de la cantidad de piridinolina monosacarídica corresponde a una degradación del colágeno de origen óseo, mientras que el aumento de la cantidad de piridinolina y la ausencia de piridinolina glicosilada corresponde a una degradación del colágeno de origen cartilaginoso.

Definiciones

- La piridinolina diglicosilada se designa por la abreviatura Pyr-Gal-Glc y también se denomina glucosil-galactosil-piridinolina o piridinolina disacarídica.

- Un "individuo" puede pertenecer a una o varias de las categorías siguientes:

  - individuo susceptible de estar afectado de una patología sinovial

  - un modelo para una patología determinada y principalmente un modelo que se utiliza en los estudios preclínicos

  - un ser humano

  - un enfermo

  - un paciente o un individuo que experimenta un tratamiento médico o una operación quirúrgica

  - un individuo que recibe o ha recibido tratamiento para una patología osteoarticular

  - un individuo afectado de una patología sinovial o del que se sospecha que está afectado de dicha patología

  - un individuo afectado de una patología osteoarticular

  - un individuo que no está afectado de osteoporosis

  - un individuo en período de crecimiento

  - un individuo de sexo masculino

  - un individuo de sexo femenino

  - un niño

  - un adulto

- un individuo de sexo femenino pre o postmenopaúsico

- un animal tal como una rata, un ratón, un conejo, un cordero, un primate o un caballo de carreras;

- Un "marcador específico de patología sinovial" significa una substancia o un compuesto que permite distinguir una patología sinovial de otras patologías y particularmente de una afectación del hueso y/o del cartílago. Preferentemente, el marcador específico de patología sinovial es un marcador de la degradación del colágeno sinovial.

- Una "patología sinovial" significa un aumento del turn-over, una proliferación, una degradación, una inflamación, una destrucción, una descomposición, una remodelación patológica o una degradación de la sinovial o del colágeno sinovial;

- Un "colágeno sinovial" significa un colágeno de tipo I, III, IV, V o VI, o una mezcla de colágenos seleccionados de entre dichos colágenos. Preferentemente, se trata de un colágeno mayoritariamente de tipo I y III;

- Una "patología osteoarticular" significa una patología de una o varias articulaciones, o que implica una proliferación de la sinovial y una afectación del cartílago. Una patología osteoarticular puede ser un reumatismo inflamatorio, una artropatía metabólica o un reumatismo degenerativo, una poliartritis reumatoide, una espondilartropatía, la gota, la condrocalcinosis o la artrosis.

- Una "muestra biológica" significa un líquido corporal. El líquido corporal se extrae generalmente del individuo antes de llevar a cabo un procedimiento según la invención. El líquido corporal puede seleccionarse de entre sangre, el suero, el plasma, la orina, la saliva, el sudor o el líquido sinovial. El líquido sinovial es ventajoso, en la medida en que es específico del tejido sinovial o de la sinovial. Una muestra biológica puede ser un tejido extraído del individuo. El tejido puede cultivarse antes de que se lleve a cabo la medición o la detección en este tejido. El tejido puede ser la sinovial.

- El "estadio destructor" (destructivo) de una patología osteoarticular corresponde al estadio en el que la destrucción o la degradación de los tejidos articulares puede visualizarse mediante radiografía, mediante resonancia magnética o mediante resonancia magnética nuclear. El estadio no destructor (no destructivo) corresponde al estadio en el que la destrucción o la degradación de los tejidos articulares no puede todavía apreciarse visualmente mediante radiografía, mediante resonancia magnética o mediante resonancia magnética nuclear.

- La "piridinolina libre" significa la piridinolina que no está unida a ningún péptido.

- La "piridinolina glicosilada" significa la piridinolina que transporta unos grupos glicosilados. "Piridinolina glicosilada" comprende a la vez la piridinolina glicosilada que transporta residuos peptídicos y la piridinolina glicosilada sin péptidos. Según la técnica utilizada para medir la piridinolina glicosilada, y según la técnica utilizada para la preparación de la muestra biológica (hidrólisis alcalina o ausencia de hidrólisis), el procedimiento de la invención puede medir exclusivamente la piridinolina glicosilada libre, o alternativamente, la piridinolina glicosilada total.

Los procedimientos según la invención que se describen en la continuación de la presente memoria pueden ser unas técnicas cualitativas o cuantitativas o a la vez, cuantitativas y cualitativas. De este modo, los procedimientos que se describen en la continuación de la presente memoria, en los que se mide una variación de la cantidad de un marcador específico, pueden ser unos procedimientos cuantitativos. Los procedimientos que se describen en la continuación de la presente memoria en los que se detecta la presencia de un marcador específico, pueden ser unos procedimientos cualitativos.

Generalmente, la invención se refiere a un procedimiento para llevar a cabo el seguimiento de la degradación del colágeno sinovial en un individuo. La degradación del colágeno sinovial puede ser normal (es decir, no patológica, en el contexto del turn-over sinovial normal) o patológica. Los procedimientos de la invención se aplican de forma particularmente ventajosa en el seguimiento, en el diagnóstico y en el pronóstico de las patologías sinoviales, así como en la evaluación de la eficacia de los tratamientos terapéuticos.

Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico, eventualmente precoz, o el seguimiento de la evolución de una patología osteoarticular que implique la degradación de colágeno sinovial. Este procedimiento está caracterizado porque:

i) se pone en contacto *in vitro* una muestra biológica que procede de un individuo, con un medio para medir un marcador específico del nivel de degradación del colágeno sinovial;

ii) se determina el nivel del marcador específico.

Preferentemente, el marcador es un marcador cuyo nivel refleja por sí solo el nivel de degradación del colágeno sinovial.

Según un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico o el seguimiento de la evolución de una patología sinovial caracterizado porque:

i) se pone en contacto *in vitro* una muestra biológica que procede de un individuo, con un medio para medir un marcador específico de patología sinovial;

ii) se determina el nivel del marcador específico.

iii) se compara el nivel del marcador con un nivel de referencia que representa la ausencia de la patología, o que representa un estadio predeterminado de la patología, indicando el nivel del marcador con relación al nivel de referencia la presencia o la evolución de la patología sinovial.

Un procedimiento según este aspecto de la invención permite determinar una evolución positiva o negativa en una patología sinovial, así como detectar la aparición o el fin de dicha patología.

El individuo preferido según el primer aspecto de la invención está afectado de patología sinovial, o es susceptible de estar afectado de la patología sinovial, es decir, que presenta o no síntomas de una patología sinovial.

El marcador específico de patología sinovial preferido es la piridinolina diglicosilada.

En la aplicación diagnóstica del procedimiento según el primer aspecto de la invención, el nivel de referencia que representa la ausencia de la patología o que representa un estadio predeterminado de la patología, puede seleccionarse en función del valor medio o del valor máximo medido para el marcador específico en una muestra de individuos que no están afectados de una patología.

La selección del nivel de referencia para la aplicación diagnóstica del procedimiento según el primer aspecto de la invención, puede determinarse por el experto en la materia en función del marcador específico de patología sinovial seleccionado, así como de la técnica utilizada para medir el marcador específico de la patología sinovial.

Si el marcador seleccionado es la piridinolina diglicosilada y la técnica es la HPLC, el nivel de referencia que delimita el estado patológico del estado no patológico puede estar comprendido en el intervalo de valores comprendidos entre aproximadamente 5 (nmoles/mmoles de creatinina) y aproximadamente 9 (nmoles/mmoles de creatinina).

En la aplicación del procedimiento de seguimiento de la evolución de una patología sinovial según el primer aspecto de la invención, el nivel de referencia puede corresponder al límite entre el estado no patológico y el estado patológico para una patología sinovial o al límite entre dos estadios distintos de la evolución de la patología sinovial. Dos estadios distintos de la evolución de una patología sinovial pueden ser el estadio no destructivo y el estadio destructivo

El límite entre dos estadios distintos de la evolución de una patología sinovial puede seleccionarse en el intervalo de valores comprendidos entre el valor medio más una desviación tipo y el valor medio más tres desviaciones tipo, medidos en una muestra control representativa de individuos no patológicos que no están afectados de patología sinovial. Un valor particularmente apropiado es el del valor medio más dos desviaciones tipo.

El límite entre dos estadios distintos de la evolución de una patología sinovial, puede seleccionarse en el intervalo de valores comprendidos entre el valor medio más una desviación tipo y el valor medio más tres desviaciones tipo medidos en una muestra representativa de individuos que se encuentran en el estadio menos avanzado entre los dos estadios distintos de la evolución de una patología sinovial. Un valor particularmente apropiado es el del valor medio más dos desviaciones tipo.

El nivel de referencia del marcador específico puede ser el nivel medido anteriormente en el mismo individuo.

La selección del nivel de referencia para el seguimiento de la evolución de una patología sinovial según el primer aspecto de la invención, puede determinarse por el experto en la materia en función del marcador específico de patología sinovial seleccionado, y de la técnica utilizada para medir dicho marcador específico.

Si el marcador específico seleccionado es la piridinolina diglicosilada y la técnica es la de HPLC, el nivel de referencia que delimita dos estadios distintos de la patología, y particularmente el estadio no destructivo del estadio destructivo, puede estar comprendido en el intervalo de valores comprendidos entre aproximadamente 5 (n mol/m mol de creatinina) y aproximadamente 9 (n mol/m mol de creatinina).

La invención se refiere asimismo a un kit para el diagnóstico o el seguimiento de la evolución de una patología sinovial, caracterizado porque comprende por lo menos un medio para medir un marcador específico de patología sinovial y una mención del nivel de referencia que representa la ausencia de la patología o que representa un estadio predeterminado de la patología.

Según una variante preferida de la invención, la patología sinovial es una patología osteoarticular. Según este segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para el seguimiento de la evolución de una patología osteoarticular, caracterizado porque:

i) se pone en contacto *in vitro* una muestra biológica que procede de un individuo, con un medio para medir un marcador específico de patología sinovial;

ii) se determina el nivel del marcador específico;

iii) se compara el nivel del marcador con un nivel de referencia que representa un estadio predeterminado de la patología, indicando el nivel del marcador con relación al nivel de referencia la evolución de la patología osteoarticular.

Un procedimiento según el segundo aspecto de la invención permite determinar una evolución positiva o negativa en una patología osteoarticular, así como detectar la aparición o el fin de dicha patología.

Preferentemente, según este aspecto, el individuo está ya afectado por una patología osteoarticular.

La invención se refiere asimismo a un kit para el seguimiento de la evolución de una patología osteoarticular, caracterizado porque comprende por lo menos un medio para medir un marcador específico de la patología sinovial y una mención del nivel de referencia que representa la ausencia de la patología, o que representa un estadio predeterminado de la patología.

Según esta variante, el marcador específico preferido de la patología sinovial es asimismo la piridinolina diglicosilada.

El nivel de referencia, para el procedimiento y el kit según el segundo aspecto de la invención, puede corresponder al límite entre el estado no patológico y el estado patológico o al límite entre dos estadios distintos de la evolución de la patología. Dos estadios distintos de la evolución de una patología osteoarticular pueden ser el estadio no destructivo y el estadio destructivo.

El límite entre el estadio patológico y el estadio no patológico de una patología osteoarticular, puede seleccionarse en un intervalo de valores comprendidos entre el valor medio más una desviación tipo y el valor medio más tres desviaciones tipo medidos en una muestra control representativa de individuos no patológicos o que no están afectados de patología osteoarticular. Un valor particularmente apropiado es el valor medio más dos desviaciones tipo.

El límite entre dos estadios distintos de la evolución de una patología osteoarticular puede seleccionarse en un intervalo de valores comprendidos entre el valor medio más una desviación tipo y el valor medio más tres desviaciones tipo medidos en una muestra control representativa de individuos no patológicos o que no están afectados de una patología osteoarticular. Un valor particularmente apropiado es el del valor medio más dos desviaciones tipo.

El límite entre dos estadios distintos de la evolución de una patología osteoarticular puede seleccionarse en el intervalo de valores comprendidos entre el valor medio más una desviación tipo y el valor medio más tres desviaciones tipo medidos en una muestra representativa de individuos que se encuentran en el estadio menos avanzado entre los dos estadios distintos de la evolución de una patología osteoarticular. Un valor particularmente apropiado es el del valor medio más dos desviaciones tipo.

El nivel de referencia, para el procedimiento y el kit según el segundo aspecto de la invención, puede ser el nivel medido anteriormente en el mismo individuo.

La selección del nivel de referencia, para el procedimiento y el kit según el segundo aspecto de la invención, puede determinarse por el experto en la materia en función del marcador específico de patología sinovial seleccionado y de la técnica utilizada para medir dicho marcador específico.

Si el marcador seleccionado es la piridinolina diglicosilada y la técnica es la HPLC, el nivel de referencia que delimita el estado no patológico del estado patológico puede estar comprendido entre aproximadamente 5 (nmoles/mmoles de creatinina) y aproximadamente 9 (nmoles/mmoles de creatinina).

Si el marcador seleccionado es la piridinolina diglicosilada y la técnica es la de HPLC, el nivel de referencia que delimita dos estadios distintos de la evolución de una patología osteoarticular, puede estar comprendido entre aproximadamente 5 (n mol/m mol de creatinina) y aproximadamente 9 (n mol/m mol de creatinina).

Según un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la determinación del pronóstico de evolución hacia una patología osteoarticular o hacia un estadio de patología osteoarticular. Efectivamente, los inventores han constatado que el nivel de un marcador específico de degradación sinovial, por ejemplo la piridinolina diglicosilada en un individuo, puede indicar con respecto a un nivel de referencia predeterminado, el riesgo que comporta

este individuo de experimentar una destrucción acelerada de las articulaciones. Este procedimiento se caracteriza porque:

i) se pone en contacto *in vitro* una muestra biológica que procede de un individuo, con un medio para medir un marcador específico de patología sinovial;

ii) se determina el nivel del marcador específico;

iii) se compara el nivel del marcador con un nivel de referencia y se deduce un pronóstico de evolución hacia una patología osteoarticular o hacia un estadio de patología osteoarticular.

Un individuo preferido según el tercer aspecto de la invención, está afectado de patología osteoarticular o es susceptible de estar afectado de patología osteoarticular.

Para este aspecto de la invención, el marcador específico preferido de patología sinovial es la piridinolina diglicosilada.

La invención se refiere asimismo a un kit de diagnóstico para la determinación de un pronóstico de evolución hacia una patología osteoarticular o hacia un estadio de patología osteoarticular, caracterizado porque comprende por lo menos un medio para medir un marcador específico de la patología sinovial y una mención del nivel de referencia que representa un pronóstico.

Un procedimiento o un kit según el tercer aspecto de la invención permite dar un pronóstico de evolución hacia una patología osteoarticular para un individuo que no presenta una patología osteoarticular, o hacia un estadio de patología osteoarticular, particularmente el estado destructivo, para un individuo que se encuentra en un estadio no destructivo de patología osteoarticular.

El pronóstico que se puede determinar mediante un procedimiento o un kit, según el tercer aspecto de la invención, puede cubrir particularmente un período de 1, 2, 3, 4 ó 5 años.

El nivel de referencia para un procedimiento o un kit según el tercer aspecto de la invención puede determinarse mediante un estudio de seguimiento longitudinal de una muestra de individuos con riesgo de una patología osteoarticular o de individuos en un estadio no destructivo de patología osteoarticular. El nivel de referencia del procedimiento descrito anteriormente puede determinarse asimismo mediante el análisis de muestras existentes extraídas en distintos momentos para un mismo individuo.

Según un cuarto aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para determinar la eficacia de un medicamento administrado a un individuo para el tratamiento de una patología osteoarticular, caracterizado porque:

i) se pone en contacto *in vitro* una muestra biológica que procede de un individuo en tratamiento, con un medio para medir un marcador específico de patología sinovial;

ii) se determina el nivel del marcador específico;

iii) se compara el nivel del marcador con un nivel de referencia que representa un estadio predeterminado de la patología, indicando el nivel del marcador con relación al nivel de referencia la evolución de la patología sinovial y, de esta forma, el grado de eficacia del tratamiento.

Un individuo según el cuarto aspecto de la invención, es preferentemente un animal que se utiliza como modelo para el estudio preclínico de la eficacia de tratamiento de una patología osteoarticular determinada, o puede ser un ser humano de cuyo tratamiento se realiza el seguimiento.

La invención se refiere asimismo a un kit para determinar la eficacia de un medicamento que se administra a un individuo para el tratamiento de una patología osteoarticular, caracterizado porque comprende por lo menos un medio para medir un marcador específico de patología sinovial, y una mención del nivel de referencia que representa un nivel de eficacia del medicamento.

Para el cuarto aspecto de la invención, el marcador específico de patología sinovial preferido es la piridinolina diglicosilada.

El tratamiento puede ser curativo o profiláctico.

El nivel de referencia según el cuarto aspecto de la invención, puede ser el nivel medido anteriormente en el mismo individuo. El nivel medido anteriormente se mide preferentemente antes del comienzo del tratamiento curativo o profiláctico de una patología osteoarticular o antes de la administración del medicamento destinado al tratamiento de una patología osteoarticular.

El nivel de referencia según el cuarto aspecto de la invención, puede corresponder al límite entre el estado no patológico y el estado patológico para una patología osteoarticular o al límite entre dos estadios distintos de la evolución de la patología osteoarticular. Dos estadios distintos de la evolución de una patología osteoarticular pueden ser el estadio no destructivo y el estado destructivo.

El límite entre el estadio patológico y el estadio no patológico para una patología osteoarticular, puede seleccionarse en el intervalo de valores comprendidos entre el valor medio más una desviación tipo y el valor medio más tres desviaciones tipo medidos en una muestra control representativa de individuos no patológicos o que no están afectados de una patología osteoarticular. Un valor particularmente apropiado es el valor medio más dos desviaciones tipo.

El límite entre dos estadios distintos de la evolución de una patología osteoarticular puede seleccionarse en el intervalo de valores comprendidos entre el valor medio más una desviación tipo y el valor medio más tres desviaciones tipo medidos en una muestra control representativa de individuos no patológicos o que no están afectados de patología osteoarticular. Un valor particularmente apropiado es el del valor medio más dos desviaciones tipo.

El límite entre dos estadios distintos de la evolución de una patología osteoarticular puede seleccionarse en el intervalo de valores comprendidos entre el valor medio más una desviación tipo y el valor medio más tres desviaciones tipo que se miden en una muestra representativa de individuos que se encuentran en el estadio menos avanzado entre los dos estadios distintos de la evolución de una patología osteoarticular. Un valor particularmente apropiado es el del valor medio más dos desviaciones tipo.

La selección del nivel de referencia según el cuarto aspecto de la invención, se puede determinar por el experto en la materia en función del marcador específico de patología sinovial seleccionado y de la técnica utilizada para medir dicho marcador específico.

Si el marcador seleccionado es la piridinolina diglicosilada y la técnica es la HPLC, el nivel de referencia que delimita el estado no patológico del estado patológico para una patología osteoarticular, puede estar comprendido entre aproximadamente 5 (nmoles/mmoles de creatinina) y aproximadamente 9 (nmoles/mmoles de creatinina).

Si el marcador seleccionado es la piridinolina diglicosilada y la técnica es la de HPLC, el nivel de referencia que delimita dos estadios distintos de la evolución de una patología osteoarticular, puede estar comprendido entre aproximadamente 5 (n mol/m mol de creatinina) y aproximadamente 9 (n mol/m mol de creatinina).

La eficacia del tratamiento curativo o profiláctico, que se deduce del procedimiento o del kit según el cuarto aspecto de la invención, puede ser positiva, nula o negativa.

Si de la comparación del nivel del marcador medido con un nivel de referencia, se deduce una tendencia a la mejoría del estado del individuo estudiado, se puede entonces concluir que el tratamiento curativo o profiláctico utilizado para este individuo presenta por lo menos un comienzo de eficacia. La diferencia entre el nivel del marcador medido en el individuo y el nivel de referencia, permite apreciar de forma cuantitativa o cualitativa el nivel de eficacia del tratamiento curativo o profiláctico ensayado.

La eficacia de un tratamiento curativo (curación) o profiláctico (prevención) de una patología osteoarticular, puede, de esta forma, correlacionarse con una medición de la variación de la cantidad de un marcador específico de la patología sinovial.

La presente invención da a conocer asimismo un procedimiento para determinar la toxicidad asociada a una patología osteoarticular o sinovial de un medicamento destinado al tratamiento de una patología. Efectivamente, ciertos medicamentos pueden provocar efectos secundarios a nivel sinovial y particularmente pueden llevar a una degradación del colágeno sinovial. Este procedimiento se caracteriza porque:

i) se pone en contacto *in vitro* una muestra biológica que procede de un individuo, con un medio para medir un marcador específico de patología sinovial;

ii) se mide el nivel de este marcador específico;

iii) eventualmente, se compara el nivel de este marcador con un nivel de referencia que representa la presencia de un estadio predeterminado de la patología, indicando el nivel del marcador con relación al nivel de referencia el grado de la patología y de este modo, el grado de la toxicidad asociada a una patología sinovial o osteoarticular.

La descripción se refiere asimismo a un kit de diagnóstico para la determinación de la toxicidad de un medicamento destinado al tratamiento de una patología, caracterizado porque comprende por lo menos un medio para medir un marcador específico de patología sinovial y una mención del nivel de referencia que representa un nivel de toxicidad del medicamento.

Por medicamento, se entiende en particular cualquier composición farmacéutica cuya toxicidad en el individuo es susceptible de estar asociada o de expresarse por una patología sinovial o una patología osteoarticular.

El nivel de referencia puede corresponder al límite entre el estado no patológico y el estado patológico para una patología osteoarticular o al límite entre dos estadios distintos de la evolución de la patología osteoarticular. Dos estadios distintos de la evolución de una patología osteoarticular pueden ser el estadio no destructivo y el estado destructivo.

El límite entre el estadio patológico y el estadio no patológico para una patología osteoarticular puede seleccionarse en el intervalo de valores comprendidos entre el valor medio más una desviación tipo y el valor medio más tres desviaciones tipo medidos en una muestra control representativa de individuos no patológicos o que no están afectados de patología osteoarticular. Un valor particularmente apropiado es el del valor medio más dos desviaciones tipo.

El límite entre dos estadios distintos de la evolución de una patología osteoarticular puede seleccionarse en el intervalo de valores comprendidos entre el valor medio más una desviación tipo y el valor medio más tres desviaciones tipo medidos en una muestra control representativa de individuos no patológicos o que no están afectados de patología osteoarticular. Un valor particularmente apropiado es el del valor medio más dos desviaciones tipo.

El límite entre dos estadios distintos de la evolución de una patología osteoarticular puede seleccionarse en el intervalo de valores comprendidos entre el valor medio más una desviación tipo y el valor medio más tres desviaciones tipo medidos en una muestra representativa de individuos que se encuentran en el estadio menos avanzado entre los dos estadios distintos de la evolución de una patología osteoarticular. Un valor particularmente apropiado es el del valor medio más dos desviaciones tipo.

El nivel de referencia puede ser el nivel medido anteriormente en el mismo individuo. El nivel medido anteriormente se mide preferentemente antes del comienzo del tratamiento curativo o profiláctico o antes de la administración del medicamento.

La selección del nivel de referencia puede determinarse por el experto en la materia en función del marcador específico de patología sinovial escogido y de la técnica utilizada para medir dicho marcador específico.

Si el marcador seleccionado es la piridinolina diglicosilada y la técnica es la HPLC, el nivel de referencia que delimita el estado no patológico del estado patológico para una patología osteoarticular puede estar comprendido entre aproximadamente 5 (nmoles/mmoles de creatinina) y aproximadamente 9 (nmoles/mmoles de creatinina).

Si el marcador seleccionado es la piridinolina diglicosilada y la técnica es la de HPLC, el nivel de referencia que delimita dos estadios distintos de la evolución de una patología osteoarticular puede estar comprendido entre aproximadamente 5 (n mol/m mol de creatinina) y aproximadamente 9 (n mol/m mol de creatinina).

La toxicidad del tratamiento curativo o profiláctico que se deduce de este procedimiento, puede existir o ser nula.

Si de la comparación del nivel del marcador medido con un nivel de referencia, se deduce una aparición de patología sinovial u osteoarticular, se puede entonces concluir que el tratamiento curativo o profiláctico que se ha utilizado para este individuo presenta por lo menos un principio de toxicidad. La diferencia entre el nivel del marcador medido en el individuo y el nivel de referencia permite apreciar de forma cuantitativa o cualitativa el nivel de toxicidad del tratamiento curativo o profiláctico ensayado.

Efectivamente, ciertos tratamientos o medicamentos presentan como efecto tóxico una patología sinovial o una patología osteoarticular. La detección de dichas patologías permite por tanto detectar la toxicidad de un tratamiento o de un medicamento.

La presente descripción da a conocer asimismo un procedimiento para el diagnóstico precoz de una patología osteoarticular, caracterizado porque:

i) se pone en contacto *in vitro* una muestra biológica que procede de un individuo, con un medio para medir un marcador específico de patología sinovial;

ii) se determina el nivel del marcador específico;

iii) eventualmente, se compara el nivel de este marcador con un nivel de referencia que representa la presencia de la patología, indicando el nivel del marcador con relación al nivel de referencia la presencia actual o potencial de la patología sinovial.

Siendo el tejido sinovial uno de los primeros afectados en una patología osteoarticular, por ejemplo, la poliartritis reumatoide, dicho procedimiento constituye un medio de detectar de forma precoz, presintomática o antes de la fase destructiva, la aparición de una patología osteoarticular.

Asimismo, un kit para el diagnóstico precoz de una patología sinovial, está caracterizado porque comprende por lo menos un medio para medir un marcador específico de patología sinovial y una mención del nivel de referencia que representa la ausencia de patología.

Un individuo preferido está afectado de patología osteoarticular o es susceptible de estar afectado de patología osteoarticular.

El marcador específico de patología sinovial preferido es la piridinolina diglicosilada.

El nivel de referencia puede corresponder al límite entre el estado no patológico y el estado patológico para una patología osteoarticular.

El límite entre el estadio patológico y el estadio no patológico para una patología osteoarticular puede seleccionarse en el intervalo de valores comprendidos entre el valor medio más una desviación tipo y el valor medio más tres desviaciones tipos medidos en una muestra control representativa de individuos no patológicos o que no están afectados de patología osteoarticular. Un valor particularmente apropiado es el del valor medio más dos desviaciones tipo.

La selección del nivel de referencia puede determinarse por el experto en la materia en función del marcador específico de patología sinovial escogido, así como de la técnica utilizada para medir el marcador específico de patología sinovial.

Si el marcador seleccionado es la piridinolina diglicosilada y la técnica es la HPLC, el nivel de referencia que delimita el estado no patológico del estado patológico para una patología osteoarticular, puede estar comprendido entre aproximadamente 5 (nmoles/mmoles de creatinina) y aproximadamente 9 (nmoles/mmoles de creatinina).

En todos los procedimientos o kits según la invención, la medición del nivel del marcador específico de patología sinovial puede llevarse a cabo mediante una técnica inmunológica, inmunodosificación, fluorescencia, espectroscopia ultravioleta o incluso mediante detección electroquímica.

Por técnica inmunológica o inmunodosificación, se puede entender una técnica que utiliza unos anticuerpos específicos monoclonales o policlonales, una técnica ELISA, una técnica inmunoenzimática, una técnica de inmunofluorescencia, una técnica radioinmunológica, una técnica electroquimioinmunológica o una técnica quimioinmunológica.

Por técnica inmunológica o inmuno-dosificación, se puede entender cualquiera de las técnicas descritas en la obra siguiente: Diamandis y Cristopoulos, *Immunoassay*, Academic Press, San Diego, 1996, principalmente las páginas 579 y siguientes.

Preferentemente, la medición del nivel del marcador específico se lleva a cabo a partir de una muestra biológica que no ha experimentado ninguna hidrólisis ácida o alcalina previa, particularmente cuando se trata de orina.

El marcador específico de la patología sinovial preferido es la piridinolina diglicosilada.

Preferentemente, la piridinolina glicosilada o la piridinolina diglicosilada está unida a uno o varios péptidos específicos del colágeno sinovial, del colágeno de tipo I, del colágeno de tipo III, del colágeno de tipo IV, del colágeno de tipo V, del colágeno de tipo VI, del colágeno de tipo I y III o de una mezcla de colágenos seleccionados de entre los tipos I, III, IV, IV, V y VI.

La forma diglicosilada de la piridinolina se purifica ventajosamente y se caracteriza según el procedimiento que se describe en el ejemplo 3 de la presente solicitud.

La glucosil-galactosil piridinolina aislada o en forma purificada, puede ser utilizada en la producción de anticuerpos en un individuo.

Un medio para medir un marcador específico de patología sinovial es, preferentemente, un anticuerpo capaz de reconocer de forma específica un marcador específico de patología sinovial y particularmente, la glucosil-galactosil-piridinolina.

La descripción da a conocer también un anticuerpo capaz de reconocer de forma específica la glucosil-galactosil-pìridinolina.

Por "reconocer de forma específica la glucosil-galactosil-piridinolina", se puede entender la capacidad de distinguir la glucosil-galactosil-piridinolina de los otros derivados de la piridinolina que no comprenden la parte disacarídica o la parte glucosil-galactosil de la glucosil-galactosil-piridinolina. Preferentemente, dichos anticuerpos no presentan reactividad cruzada con derivados de la piridinolina, que no sean el derivado diglicosilado.

Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y reconocen preferentemente uno o varios epítopos únicos en la forma diglicosilada de la piridinolina. Puede tratarse de la piridinolina glicosilada libre (sin péptido) o de la piridinolina glicosilada unida a residuos peptídicos, o las dos formas.

La descripción da a conocer unos anticuerpos producidos o susceptibles de ser producidos a partir de la glucosil-galactosil-piridolina aislada o en forma purificada y particularmente a partir de la glucosil-galactosil-piridinolina aislada según la invención.

Los anticuerpos que se han definido anteriormente constituyen unos medios preferidos para la medición de un marcador específico de patología sinovial.

Los anticuerpos definidos anteriormente pueden obtenerse mediante cualquier técnica conocida hasta la fecha, que permita obtener un anticuerpo a partir de un marcador específico de patología sinovial y en particular, de la glucosil-galactosil-piridinolina.

La obtención de un anticuerpo específico de la glucosil-galactosil-piridinolina puede requerir que dicho antígeno se extraiga en una primera etapa y que sea purificado, por ejemplo, a partir de orina. Dicha extracción o purificación puede llevarse a cabo de forma ventajosa mediante la técnica descrita en el ejemplo 3 de la presente solicitud.

Leyenda de las figuras

- Figura 1

Representación esquemática de las moléculas de piridinolina que permiten la formación de puentes del colágeno.

- Figura 2

Forma hidroxi- y desoxi- de la piridinolina:

a) Piridinolina (Pyr) y

b) Desoxipiridinolina (D-Pyr)

Formas glicosiladas de la piridinolina (Pyr):

c) galactosil-piridinolina (Pyr-Gal) y

d) glucosil-galactosil piridinolina (Pyr-Gal-Glc)

- Figura 3

Perfiles de cromatografía de tejido sinovial humano (a) y (c) y de tejido óseo humano (b) y (d), tratados mediante hidrólisis alcalina. Para los perfiles (c) y (d), se añadió Pyr-gal-glc estándar purificado a partir de orina a las muestras tisulares utilizadas para los perfiles cromatográficos (a) y (b).

Pyr y D-Pyr representan, respectivamente, las formas hidroxi- y desoxi- de la piridinolina no glicosilada.

El compuesto X que se encuentra en el tejido sinovial, pero no en el tejido óseo, comigra con el Pyr-Gal-Glc estándar purificado a partir de orina.

El compuesto Y que se encuentra en el hueso y en una cantidad muy débil en el tejido sinovial, no comigra con el Pyr-Gal-Glc estándar purificado a partir de orina.

- Figura 4

Perfiles cromatográficos obtenidos a partir de tejido sinovial humano (a), de cartílago humano (b) y de hueso humano (c), hidrolizados mediante NaOH 2M durante 15 horas. Los compuestos X e Y se transforman en Pyr después de hidrólisis ácida y el compuesto X comigra con el Pyr-gal-glc estándar purificado a partir de orina.

(d) corresponde al perfil cromatográfico de una orina.

Pyr y D-Pyr representan, respectivamente, las formas hidroxi- y desoxi- de la piridinolina no glicosilada.

El compuesto X que se encuentra en el tejido sinovial pero no en el tejido óseo, comigra con el Pyr-Gal-Glc estándar purificado a partir de orina.

El compuesto Y que se encuentra en el hueso y en cantidad muy débil en el tejido sinovial no comigra con el Pyr-Gal-Glc estándar purificado a partir de orina.

- Figura 5

Porcentaje medido mediante HPLC en columna de fase inversa, de Pyr-gal-glc/Pyr libre que se encuentra en el tejido sinovial, hueso y cartílago humanos después de hidrólisis mediante NaOH 2M durante unos tiempos que varían entre 5 y 20 horas.

El símbolo “ - ” significa no detectable.

- Figura 6

Porcentaje medido mediante HPLC en columna de fase inversa, de Pyr-gal/Pyr libre que se encuentra en el hueso, cartílago y tejido sinovial humanos después de hidrólisis mediante NaOH 2M durante unos tiempos que varían entre 5 y 20 horas.

El símbolo " - " significa no detectable.

- Figura 7

• Figura 7A: perfiles cromatográficos de (a) sobrenadante de cultivo de sinovial, (b) sobrenadante de cultivo de hueso, (c) sobrenadante de cultivo de cartílago.

• Figura 7B: perfiles cromatográficos de (d) sobrenadante de cultivo de sinovial, suplementado con Pyr-gal-glc estándar, Pyr y D-Pyr, (e) sobrenadante de cultivo de hueso, suplementado con Pyr-gal-glc estándar, Pyr y D-Pyr, (f) sobrenadante de cultivo de cartílago, suplementado con Pyr-gal-glc estándar, Pyr y D-Pyr. El compuesto X del sobrenadante de cultivo de sinovial comigra con el Pyr-gal-glc estándar purificado a partir de orina y se transforma en Pyr después de hidrólisis ácida.

- Figura 8

Excreción urinaria de las piridinolinas totales (formas libres y peptídicas) y de las formas de piridinolina libres en adultos normales (controles) y en pacientes afectados de poliartritis reumatoide o de la enfermedad de Paget.

"Pyr total" significa piridinolina total o desoxipiridinolina total.

"Pyr libre" significa piridinolina libre o desoxipiridinolina libre.

- Figura 9

Porcentaje de aumento de la excreción urinaria de los distintos marcadores en la poliartritis reumatoide (PR) y en la enfermedad de Paget (Paget) por comparación con un grupo testigo véase la figura 8).

"PyrGG" significa Pyr-Gal-Glc o piridinolina diglicosilada.

- Figura 10

Correlación lineal entre un marcador específico del cartílago (CartiLaps) y la piridinolina diglicosilada (PyrGG).

- Figura 11

Comparación de la cantidad de piridinolina diglicosilada (Pyr-Gal-Glc) medida en individuos normales o en pacientes afectados de poliartritis reumatoide (PR) en un estadio destructor (AR destructiva) o no destructor (PR no destructiva).

- Figura 12

Correlación entre la excreción urinaria de Pyr-gal-glc, los índices algofuncionales de Lequesne y Womac y la interlínea articular (espacio tibio-femoral) en 50 pacientes con gonartrosis.

- Figura 13

Correlación entre la tasa de base de Pyr-Gal-Glc urinaria medida mediante HPLC y el riesgo de destrucción rápida de las articulaciones en el año siguiente, examinado mediante radiografía de las manos y de los pies con rayos X en 112 pacientes afectados de poliartritis reumatoide desde hace menos de tres años.

Ejemplos

Ejemplo 1

Estudio del tipo de glicosilación de las piridinolinas en el tejido óseo, cartilaginoso y sinovial

Procedimiento

Los tejidos humanos proceden de extracción de hueso, de cartílago y de sinovial recogidos durante intervenciones quirúrgicas para la colocación de prótesis de cadera. Las muestras tisulares se fragmentan finamente en nitrógeno líquido y se reparten a continuación en partes alícuotas de 10 mg y se hidrolizan con NaOH 2M a una temperatura de 110ºC. Los tiempos de la hidrólisis varían entre 5 y 24 horas. Al contrario que en la hidrólisis ácida, que libera los

azúcares unidos a las piridinolinas, la hidrólisis alcalina permite liberar las moléculas de piridinolinas del colágeno, sin quitar los residuos galactosa y glucosa que estén eventualmente presentes. Después de hidrólisis alcalina, se extraen las piridinolinas libres mediante cromatografía de reparto en columna de celulosa. La separación y la cuantificación de las distintas formas de piridinolinas glicosiladas se llevan a cabo mediante HPLC en columna "Ultrasphere ODS Beckman" de fase inversa (5 mm, 25 cm X 4,6 mm) con un caudal de 1 ml/minuto por una solución de acetonitrilo al 6% y ácido heptafluorobutírico al 0,15%. Se detectan gracias a sus fluorescencias naturales a longitudes de onda de excitación y emisión respectivas, de 297 y 395 nm.

Resultados

Sobre los perfiles cromatográficos obtenidos a partir de los hidrolizados alcalinos de sinovial (figura 3a) y de hueso (figura 3b), se ha podido evidenciar la presencia de dos compuestos fluorescentes denominados X e Y que sufren la elución antes que la piridinolina libre no glicosilada (Pyr). Después de la recogida y de la hidrólisis ácida se ha podido demostrar que estos dos compuestos se transformaban en piridinolina libre no glicosilada. El compuesto X, presente en los hidrolizados de tejido sinovial y ausente en los hidrilizados de tejido óseo, comigra con la glucosil-galactosil piridinolina estándar (Pyr-gal-glc) purificada a partir de orina (figura 3c). El compuesto Y, presente esencialmente en los hidrolizados de tejido óseo y que eluye justamente después que el Pyr-gal-glc estándar (figura 3d), corresponde a la forma monoglicosilada de la piridinolina (Pyr-gal). El cartílago contiene poca piridinolina glicosilada (figura 4b). Efectivamente, después de 10 horas de hidrólisis, Pyr-gal-glc únicamente representa el 2% de la Pyr libre (figura 5). El tejido sinovial contiene esencialmente Pyr-gal-glc. Representa después de 10 horas de hidrólisis el 75% de la Pyr libre (figura 5). El tejido óseo contiene esencialmente Pyr-gal. Representa después de 10 horas de hidrólisis el 39% de la Pyr libre (figura 6). Hay que poner de manifiesto asimismo que el porcentaje de piridinolinas glicosiladas disminuye cuanto más se prolonga la hidrólisis alcalina. Esto está relacionado probablemente con el hecho de que las glicosilaciones de las piridinolinas son en parte lábiles a la hidrólisis alcalina. Estos experimentos indican que el tipo de glicosilación de las moléculas de piridinolina es distinto entre el hueso, la sinovial y el cartílago. En la sinovial, la glicosilación es de tipo gal-glc, la del hueso es de tipo gal y el cartílago parece que está muy poco glicosilado.

Ejemplo 2

Estudio del tipo de glicosilación de las piridinolinas en un modelo de cultivo ex vivo de explantes tisulares humanos

Procedimientos

Las extracciones de tejido óseo, de cartílago y de sinovial, recogidas estérilmente durante las intervenciones quirúrgicas, se sitúan en recipientes estériles que contienen tampón PBS (Phosphate Buffer Saline) que contiene 100 U/ml de penicilina y 10 ng/ml de estreptomicina (Gibco, Eragny, Francia), y se transportan después rápidamente al laboratorio. Los tres tipos de tejido se separan entonces unos de otros, seccionándose a continuación en cubos de aproximadamente 5 mm de lado (125 mm^3 aproximadamente) para la sinovial y el hueso, y en láminas de aproximadamente 5 mm de lado y 1 mm de espesor (25 mm^3 aproximadamente) para el cartílago. Los fragmentos se sitúan entonces en placas de seis pocillos (Falcon, CLV, Villeurbanne, Francia) que contienen 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 Gibco, Eragny, Francia), suplementado con 2% de suero de ternera fetal (SVF) (Techgen, Les Ullis, Francia), 2 mM de glutamina (Gibco, Eragny, Francia), 20 mM de tampón Hépès (Gibco, Eragny, Francia), 100 U/ml de penicilina y 10 ng/ml de estreptomicina (Techgen, Les Ullis, Francia). Se añade interleucina 1 (IL-1) (Bachem, Bale Biochimie SARL, Voisins-le-Bretonneux, Francia) a partir del primer día a los cultivos de explantes de hueso y de sinovial, a la concentración de 1 ng/ml de medio de cultivo, y se añade plasminógeno a la concentración de 5 mM, además de IL-1 al cultivo de cartílago, con el fin de activar el proceso de degradación tisular. Los recipientes se incuban a 37ºC con un 95% de humedad y un 5% de CO_2 durante siete días.

Después de 7 días de cultivo, los sobrenadantes se filtran (Centrisart Cut-Off 5000, Sartorius) y después se analizan mediante HPLC según la técnica descrita en el ejemplo 1.

Resultados

Sobre los perfiles cromatográficos obtenidos a partir de los sobrenadantes de cultivo de tejido sinovial (figura 7a), se ha podido evidenciar la presencia de un compuesto fluorescente denominado X que sufre la elución antes que la piridinolina libre no glicosilada y comigra con el Pyr-gal-glc estándar purificado a partir de orina (figura 7d). Después de la recogida e hidrólisis ácida se ha podido mostrar que este compuesto se transformaba en piridinolina libre no glicosilada. Este compuesto X presente en los sobrenadantes de cultivo de tejido sinovial, está ausente de los sobrenadantes de cultivo de tejido óseo (figura 7b y 7e). En los sobrenadantes de cartílago (figura 7c y 7f) se encuentran sólo indicios de un compuesto que comigra con la Pyr-gal-glc estándar. Las cantidades demasiado escasas no han permitido verificar o determinar si se trataba de una forma de la piridinolina.

Estos experimentos confirman los resultados ya obtenidos con la hidrólisis alcalina de los tejidos en el ejemplo 1.

Ejemplo 3

Purificación de la forma diglicosilada de la piridinolina

La forma diglicosilada (Pyr-gal-glc) de la piridinolina se ha vuelto a encontrar en cantidades significativas en las orinas (figura 4d). Las orinas de niños (2-13 años) son relativamente ricas en piridinolina. Se ha optado por una purificación de la piridinolina diglicosilada a partir de orina.

Procedimiento

- Purificación de la piridinolina diglicosilada

Se recogieron 50 litros de orinas de niños, se filtraron y se liofilizaron. El liofilizado urinario se disolvió en agua destilada, de forma que se obtuviera una concentración X 10 de las orinas. 500 ml de las orinas concentradas se mezclaron con 500 ml de ácido acético, 2000 ml de n-butanol y 100 g de celulosa en polvo (CF1, Whatman). El conjunto se mezcló bajo agitación magnética durante 5 minutos, haciéndose después pasar por un embudo de filtración, que retuvo la celulosa. La celulosa recuperada mediante filtración, se lavó con 12 litros de una solución de lavado que contenía 8 litros de n-butanol por 2 litros de ácido acético y 2 litros de agua destilada. La operación se llevó a cabo en 12 series de lavados consecutivos por 1 litro de solución. Después del lavado, las moléculas de piridinolinas se eluyeron por 500 ml de agua destilada, liofilizándose el eluado. Después de la liofilización, los eluados se disolvieron en ácido acético al 10% y se depositaron en una columna Sephadex G10 de filtración de gel (Pharmacia) de 2 litros. Las fracciones que contenían la piridinolina diglicosilada se recuperaron y se sometieron a liofilización. El liofilizado obtenido se disolvió en ácido heptafluorobutírico al 10% y se inyectó por fracción de 500 μl en una columna en fase inversa semi-preparativa "Ultrasphere ODS C18 7 μ 250 X 10 mm (Beckman). La elución de las moléculas de Pyr-gal-glc se realizó con un caudal de 3 ml/minuto con una solución de acetonitrilo al 17% y ácido heptafluorobutírico al 0,15%. Las moléculas de Pyr-gal-glc eluídas entre 15 y 20 minutos se recogieron, liofilizaron y conservaron a -30ºC. Todas estas operaciones se repitieron con el fin de tratar los 50 litros de orina infantil.

- Caracterización mediante espectrometría de masa

Una parte alícuota de 20 mg de Pyr-gal-glc se hizo pasar por una columna de intercambio catiónico (cellulose phosphate cation exchanger, Sigma), con el fin de eliminar el ácido heptafluorobutírico.

Para la caracterización mediante espectrometría de masas, basta con referirse a las técnicas generales de espectrometría de masas.

Resultados

El procedimiento de purificación de la piridilonina diglicosilada que se describe en este ejemplo es particularmente ventajoso puesto que la etapa de paso por la celulosa se lleva a cabo en un embudo filtrante en lugar de una columna de celulosa, llevándose a cabo además antes de la etapa de filtración en el gel. La utilización de un embudo filtrante que retiene la celulosa para la etapa del paso por la celulosa y/o el cumplimiento de la etapa de la filtración en el gel después de la etapa del paso por la celulosa, son ventajosas, puesto que estas características permiten separadamente o en combinación, una rápida purificación y la facilidad de la realización del procedimiento. Dichas características permiten una ganancia de tiempo importante (aproximadamente una semana para la purificación de 50 l de orina) con respecto a las técnicas de purificación que no presentan dichas características.

La piridinolina diglicosilada obtenida en cantidad suficiente, puede utilizarse como inmunógeno para la producción de anticuerpos monoclonales.

Ejemplo 4

Estudio clínico sobre la excreción urinaria de las piridinolinas en mujeres pre y post menopaúsicas y en pacientes que presentan una enfermedad de Paget o una poliartritis reumatoide

Procedimientos

La excreción urinaria de la piridinolina y la desoxipiridinolina totales se midió mediante HPLC después de hidrólisis ácida (o total) por HCl 6N. La excreción urinaria de las formas libres de la piridinolina (piridinolina sin péptido), de la desoxipiridinolina libre (desoxipiridinolina sin péptido) se midió mediante HPLC, sin hidrólisis previa. La concentración urinaria de CrossLaps (marcador específico de la resorción ósea) (CrossLaps ELISA, Osteometer Biotech AS) y de Cartilaps (marcador específico de la degradación del cartílago) (Cartilaps ELISA, Osteometer Biotech AS), se analizaron mediante la técnica ELISA.

Cada uno de estos marcadores se midió en:

- 40 controles (mujeres premenopaúsicas y postmenopaúsicas)

- 27 pacientes que presentan una poliartritis reumatoide (PR)

- 10 pacientes que presentan una enfermedad de Paget

Resultados

La excreción urinaria de la Pyr-gal-glc aumenta significativamente (100%) en los pacientes que presentan una poliartritis reumatoide (9,6 ± 5,9) comparados con el grupo control (4,7 ± 1,4), mientras que el aumento (30%) observado en los pacientes afectados de Paget (6,1 ± 1,9) no es significativo (figuras 8 y 9). Por el contrario, las concentraciones urinarias de los otros marcadores analizados (Pyr total, DPyr total, Pyr libre, DPyr libre, Crosslaps), se encuentran en una cantidad más elevada en los pacientes afectados de la enfermedad de Paget que en los pacientes afectados de PR. Sólo la excreción urinaria del CartiLaps (marcador de la degradación del colágeno de tipo II) es más elevada en los PR (el 76%) comparados con Paget (4%). Existe una correlación significativa (p=0,0001) con un coeficiente de correlación de 0,80, entre las concentraciones de Pyr-gal-glc y de CartiLaps (figura 10). Los pacientes que presentan una PR se dividieron en dos subgrupos: PR destructivas (n=12) y PR no destructivas (n=15). La excreción urinaria de Pyr-gal-glc es más elevada en el grupo de las PR destructivas en comparación con el grupo de las PR no destructivas (figura 11). Estos resultados indican que el aumento de las tasas de Pyr-gal-glc se asocia con una destrucción articular importante.

Ejemplo 5

Estudio clínico sobre la excreción urinaria de Pyr-gal-glc en pacientes con gonartrosis

Procedimiento

La excreción urinaria de Pyr-gal-glc se midió mediante HPLC en 50 pacientes que presentaban una artrosis de la rodilla.

Resultados

La excreción urinaria de Pyr-gal-glc se ha correlacionado con los índices algofuncionales de Lequesne [Lequesne M *et al*., Scandinavian Journal of Rheumatology (1987) 18 (suplemento 65), 85-9] y Womac [Bellamy N *et al*., Journal of Rheumatologie (1988) 15. 1833-40] y con la interlínea articular (figura 12). Las correlaciones positivas obtenidas con el índice de Lequesne y el índice de Womac sugieren que el aumento de las tasas de Pyr-gal-glc está asociado con un dolor más elevado y con una disminución de la movilidad. La correlación negativa obtenida con la interlinea articular, indica que el aumento de las tasas de Pyr-gal-glc está asociado con una destrucción cartilaginosa más importante.

Ejemplo 6

Aspecto predictivo de las tasas de Pyr-Gal-Glc urinario en pacientes afectados de poliartritis reumatoide

Procedimiento

La excreción urinaria de Pyr-Gal-Glc se midió mediante HPLC en 112 pacientes afectados de poliartritis reumatoide, desde menos de tres años. La tasa medida al principio del experimento es la tasa de base que permite las comparaciones.

El estrechamiento de la interlínea articular, la erosión ósea y un resultado total que corresponde a la combinación de estos dos indicadores, son establecidos mediante radiografía de las manos y de los pies con rayos X (resultado de Sharp) en todos los pacientes, al principio del estudio, después de 6 meses y después de un año.

Resultados

Los pacientes afectados de poliartritis reumatoide y en un estadio precoz de la enfermedad, presentan tasas de Pyr-Gal-Glc en sus orinas, superiores a los 64 controles sanos del mismo sexo y de la misma edad; 7,6 n mol/m mol de creatinina contra 4,4 n mol/m mol de creatinina (p< 0,0001) para los controles.

La tabla de la figura 13 presenta los resultados del estudio longitudinal llevado a cabo en un año. Para los 112 pacientes, se examinó si presentaban un agravamiento de la patología, basándose en los tres indicadores, a saber, el estrechamiento del espacio articular, erosión ósea y combinación de los dos anteriores (resultado total). En caso de progresión de la destrucción articular basándose en la evolución de un indicador, el paciente se clasificó en la columna "sí" para este indicador, y en la otra columna en el caso contrario. El análisis de los resultados revela claramente que los pacientes que presentan mediante radiografía con rayos X una progresión de la destrucción articular en un año, tenían unos niveles básicos de Pyr-Gal-Glc en orina elevados. Los pacientes cuyos niveles básicos de Pyr-Gal-Glc eran superiores en dos desviaciones tipo con respecto al nivel medio de los controles sanos (es decir, un 39% de la población), son unos individuos que presentan un riesgo acrecentado de que la enfermedad articular progrese con un *odds-ratio* 3,6 (1,5-8,1) [intervalo de confianza: 95%]. Los resultados del estudio indican claramente que a un nivel elevado de Pyr-Gal-Glc se asocia un incremento en el riesgo de destrucción rápida de las articulaciones, que se evalúa en un año para la poliartritis reumatoide en un estadio precoz.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el diagnóstico de una patología sinovial en un individuo susceptible de estar afectado de una patología sinovial, **caracterizado** porque:

i) se pone en contacto *in vitro* una muestra biológica que procede de un individuo, con un medio para medir un marcador específico de patología sinovial, siendo dicho marcador específico de patología sinovial la piridinolina diglicosilada;

ii) se determina el nivel del marcador específico;

iii) se compara el nivel del marcador con un nivel de referencia que representa la ausencia de la patología, indicando un nivel superior del marcador con relación al nivel de referencia la presencia de la patología sinovial.

2. Procedimiento para el seguimiento de la evolución de una patología osteoarticular **caracterizado** porque:

i) se pone en contacto *in vitro* una muestra biológica que procede de un individuo, con un medio para medir un marcador específico de patología sinovial, siendo dicho marcador específico de patología sinovial la piridinolina diglicosilada;

ii) se determina el nivel del marcador específico;

iii) se compara el nivel del marcador con un nivel de referencia que representa un estadio predeterminado de la patología, indicando un nivel superior del marcador con relación al nivel de referencia la evolución de la patología osteoarticular.

3. Procedimiento para determinar un pronóstico de evolución hacia una patología osteoarticular o hacia un estadio predeterminado de patología osteoarticular, **caracterizado** porque:

i) se pone en contacto *in vitro* una muestra biológica que procede de un individuo, con un medio para medir un marcador específico de patología sinovial, siendo dicho marcador específico de patología sinovial la piridinolina diglicosilada;

ii) se determina el nivel del marcador específico;

iii) se compara el nivel del marcador con un nivel de referencia y se deduce esta comparación un pronóstico de evolución hacia una patología osteoarticular o hacia un estadio de patología osteoarticular.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 ó 3, **caracterizado** porque el individuo está afectado de patología osteoarticular o es susceptible de estar afectado de patología osteoarticular.

5. Procedimiento para la determinación de la eficacia de un medicamento administrado a un individuo para al tratamiento de una patología osteoarticular, **caracterizado** porque:

i) se pone en contacto *in vitro* una muestra biológica que procede de un individuo en tratamiento, con un medio para medir un marcador específico de patología sinovial, siendo dicho marcador específico de patología sinovial la piridinolina diglicosilada;

ii) se determina el nivel del marcador específico;

iii) se compara el nivel del marcador con un nivel de referencia que representa un estadio predeterminado de la patología, indicando el nivel del marcador con respecto al nivel de referencia la evolución de la patología sinovial, y de este modo, el grado de eficacia del tratamiento.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 5, **caracterizado** porque la patología osteoarticular es un reumatismo inflamatorio, una artropatía metabólica, un reumatismo degenerativo, la poliartrititis reumatoide, una espondilartropatía, gota, la condrocalcinosis o la artrosis.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizado** porque el estadio predeterminado es el estadio destructivo o el estadio no destructivo.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque la determinación del nivel del marcador específico de patología sinovial, se lleva a cabo mediante una técnica inmunológica, mediante inmunodosificación, fluorescencia, espectroscopía con ultravioletas, o mediante detección electroquímica.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la técnica inmunológica es una técnica que utiliza anticuerpos específicos monoclonales o policlonales, una técnica ELISA, una técnica inmunoenzimática, una técnica de inmunofluorescencia, una técnica radioinmunológica o una técnica quimioinmunológica.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque la determinación del nivel del marcador específico de patología sinovial se lleva a cabo mediante una técnica de cromatografía líquida HPLC.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el nivel de referencia se selecciona en el intervalo comprendido entre aproximadamente 5 nmoles/mmoles de creatinina y aproximadamente 9 nmoles/mmoles de creatinina.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la determinación del nivel del marcador específico de la patología sinovial se lleva a cabo en una muestra de líquido corporal.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que el líquido corporal se selecciona de entre sangre, suero, plasma, orina, saliva, sudor o líquido sinovial.

14. Kit para el diagnóstico, o el seguimiento de la evolución de una patología sinovial, **caracterizado** porque comprende por lo menos un medio para medir un marcador específico de patología sinovial, siendo dicho marcador específico de patología sinovial la piridinolina diglicosilada, y una mención del nivel de referencia que representa la ausencia de la patología o que representa un estadio predeterminado de la patología.

15. Kit para el diagnóstico, el seguimiento o el pronóstico de la evolución de una patología osteoarticular, **caracterizado** porque comprende por lo menos un medio para medir un marcador específico de patología sinovial, siendo dicho marcador específico de patología sinovial la piridinolina diglicosilada, y una mención del nivel de referencia que representa la ausencia de la patología o que representa un estadio predeterminado de la patología.

16. Kit para la determinación de la eficacia de un medicamento administrado a un individuo para el tratamiento de una patología osteoarticular, **caracterizado** porque comprende por lo menos un medio para medir un marcador específico de patología sinovial, siendo dicho marcador específico de patología sinovial la piridinolina diglicosilada, y una mención del nivel de referencia que representa un nivel de eficacia para dicho medicamento.

17. Utilización *in vitro* de piridinolina diglicosilada como marcador específico de patología sinovial.

18. Utilización *in vitro* de piridinolina diglicosilada como marcador específico de degradación del colágeno sinovial.

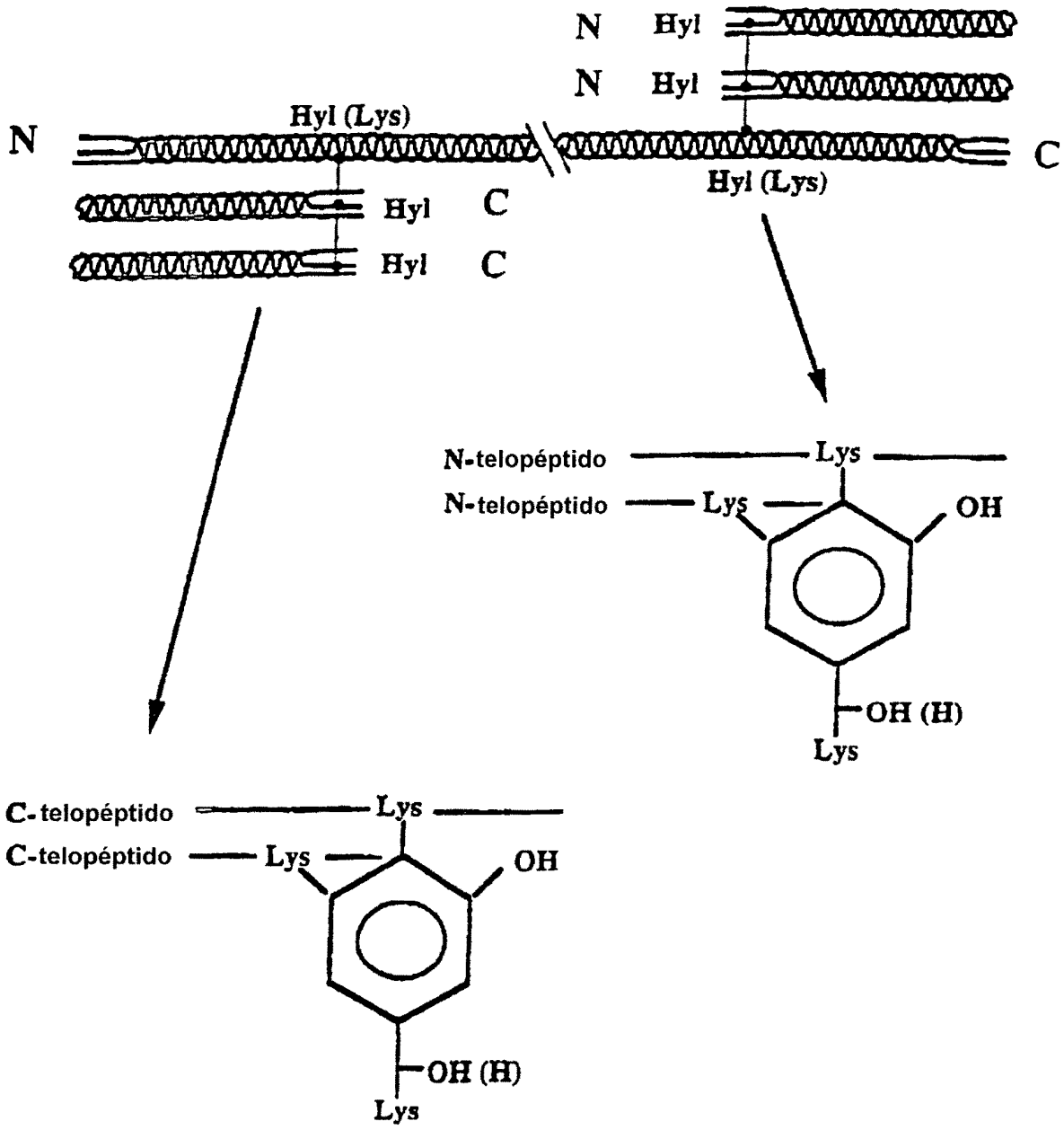

N
Hyl (Lys)
Hyl
C
Hyl
C
N
Hyl
N
Hyl
C
Hyl (Lys)
N-telopéptido
Lys
N-telopéptido
Lys
OH
OH (H)
Lys
C-telopéptido
Lys
C-telopéptido
Lys
OH
OH (H)
Lys

FIG. 1

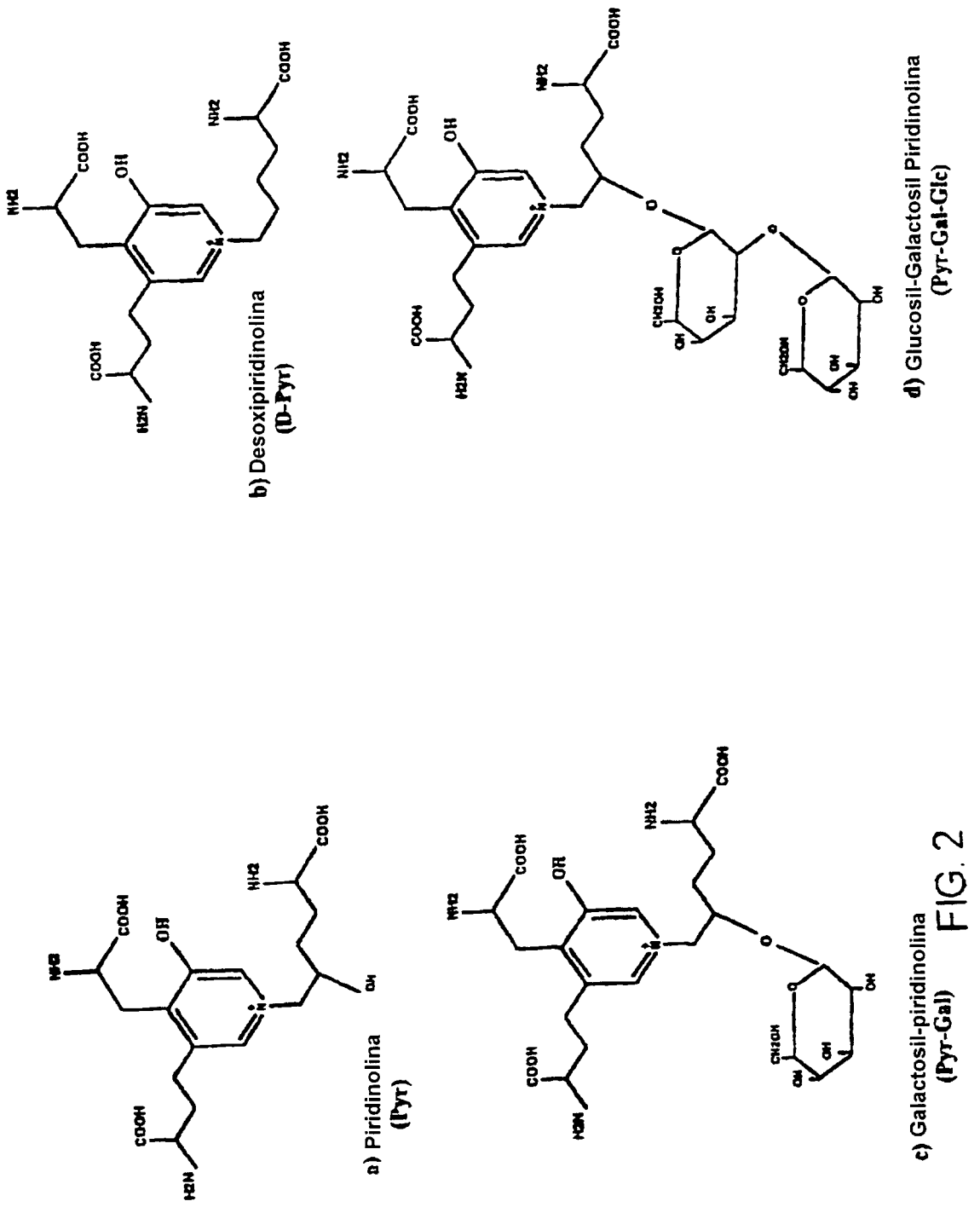

b) Desoxipiridinolina
(D-Pyr)
d) Glucosil-Galactosil Piridinolina
(Pyr-Gal-Glc)
a) Piridinolina
(Pyr)
c) Galactosil-piridinolina
(Pyr-Gal)

FIG. 2

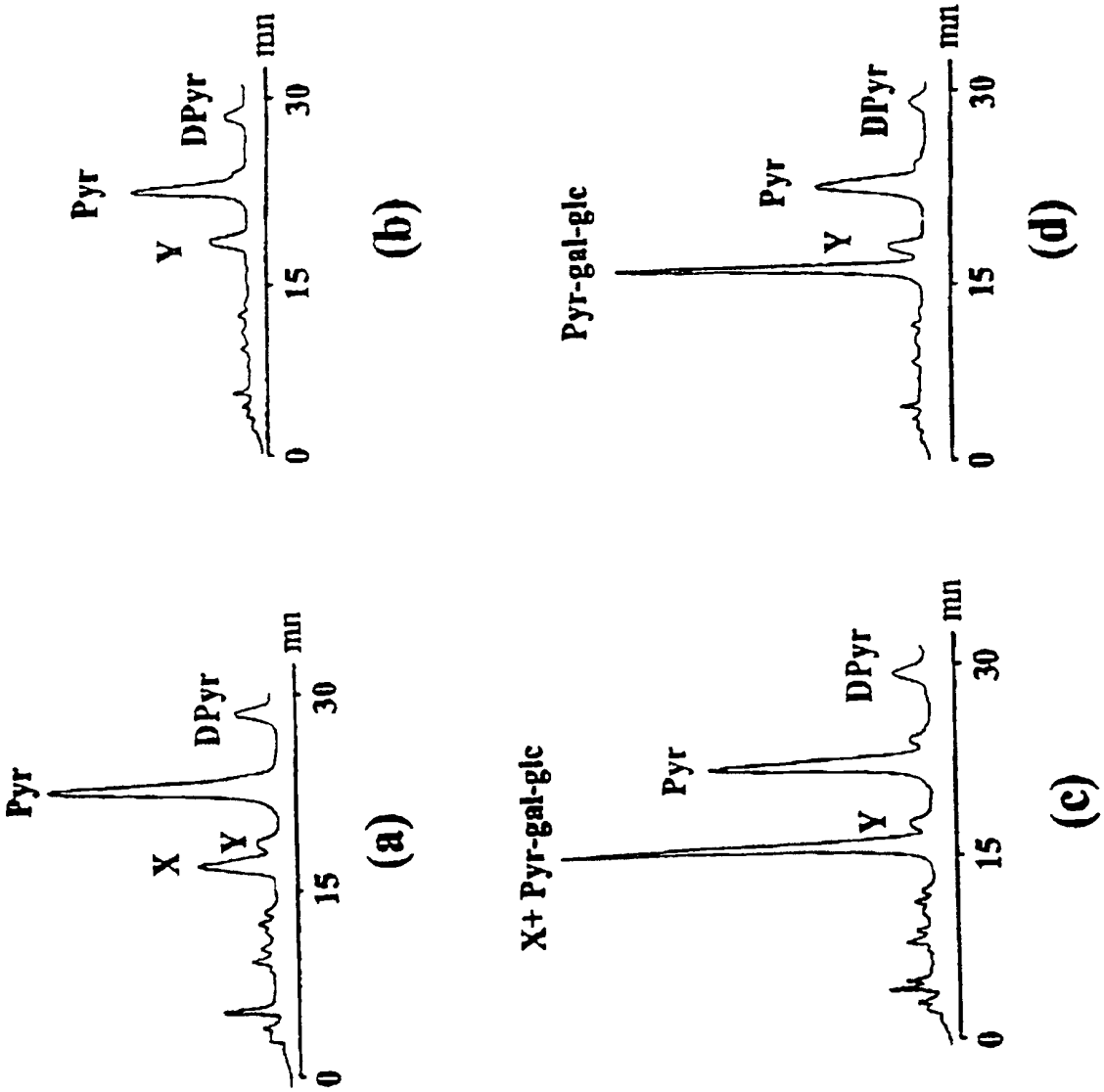

Pyr
X
Y
DPyr
mn
0
15
30
(a)
Pyr
Y
DPyr
mn
0
15
30
(b)
X+ Pyr-gal-glc
Pyr
Y
DPyr
mn
0
15
30
(c)
Pyr-gal-glc
Pyr
Y
DPyr
mn
0
15
30
(d)

FIG. 3

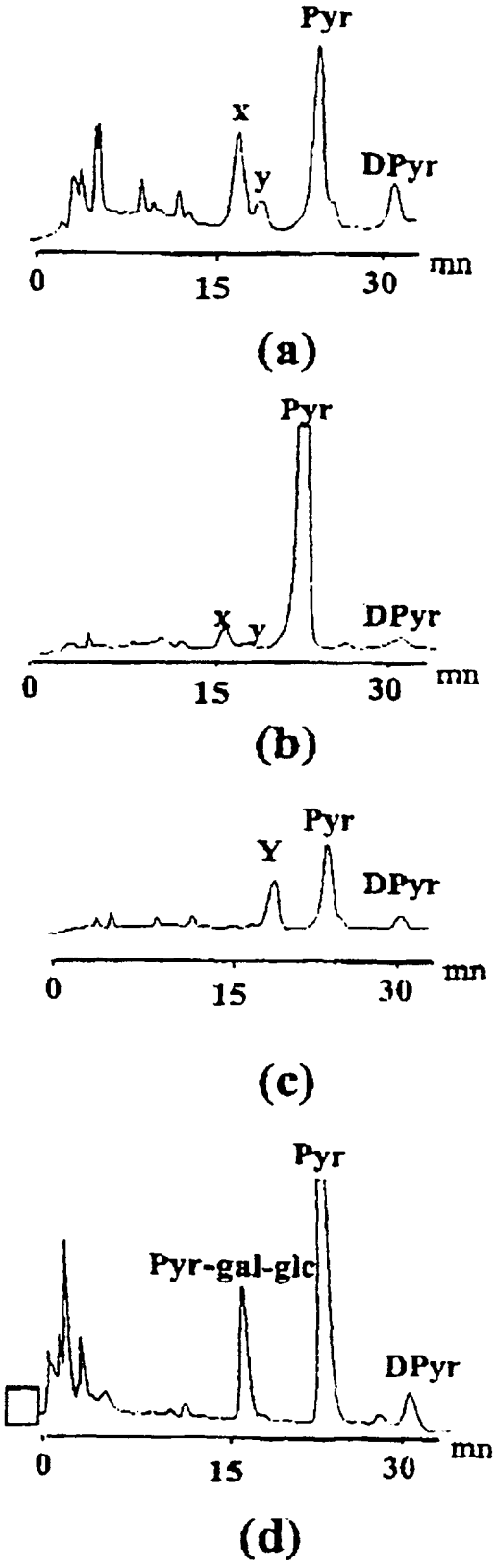

Pyr
x
y
DPyr
0
15
30
mn
(a)
Pyr
x
y
DPyr
0
15
30
mn
(b)
Pyr
Y
DPyr
0
15
30
mn
(c)
Pyr
Pyr-gal-glc
DPyr
0
15
30
mn
(d)

FIG. 4

Tiempo de hidrólisis		5 horas	10 horas	15 horas	20 horas
Tejido:					
Hueso	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
Sinovial	1	105%	94%	54%	37%
	2	72%	56%	64%	24%
Cartílago	1	6%	2%	1%	1%
	2	4%	2%	2%	1%

FIG. 5

ES 2 304 351 T3

Tiempo de hidrólisis		5 horas	10 horas	15 horas	20 horas
Tejido:					
Hueso	1	56%	33%	28%	24%
	2	55%	44%	34%	29%
Sinovial	1	16%	12%	12%	12%
	2	9%	10%	9%	9%
Cartílago	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	-

FIG. 6

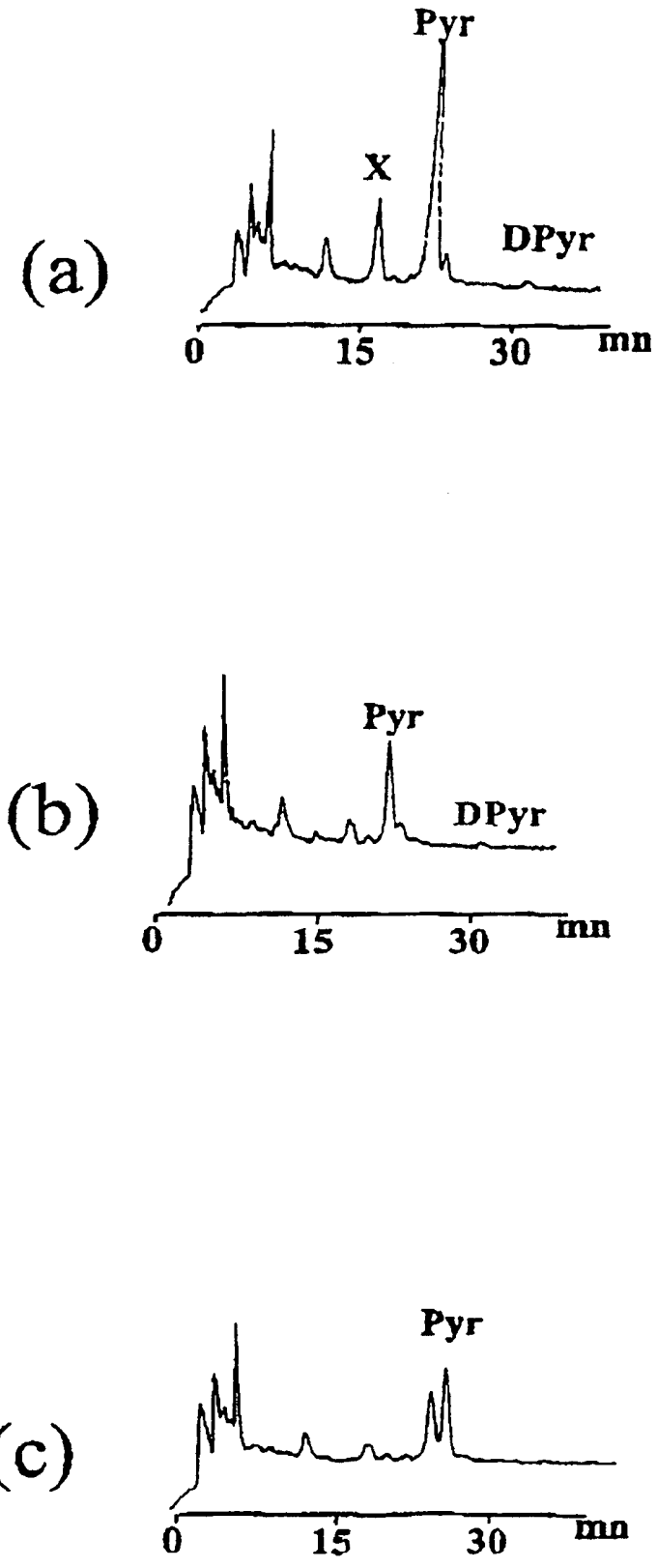


FIG. 7 A

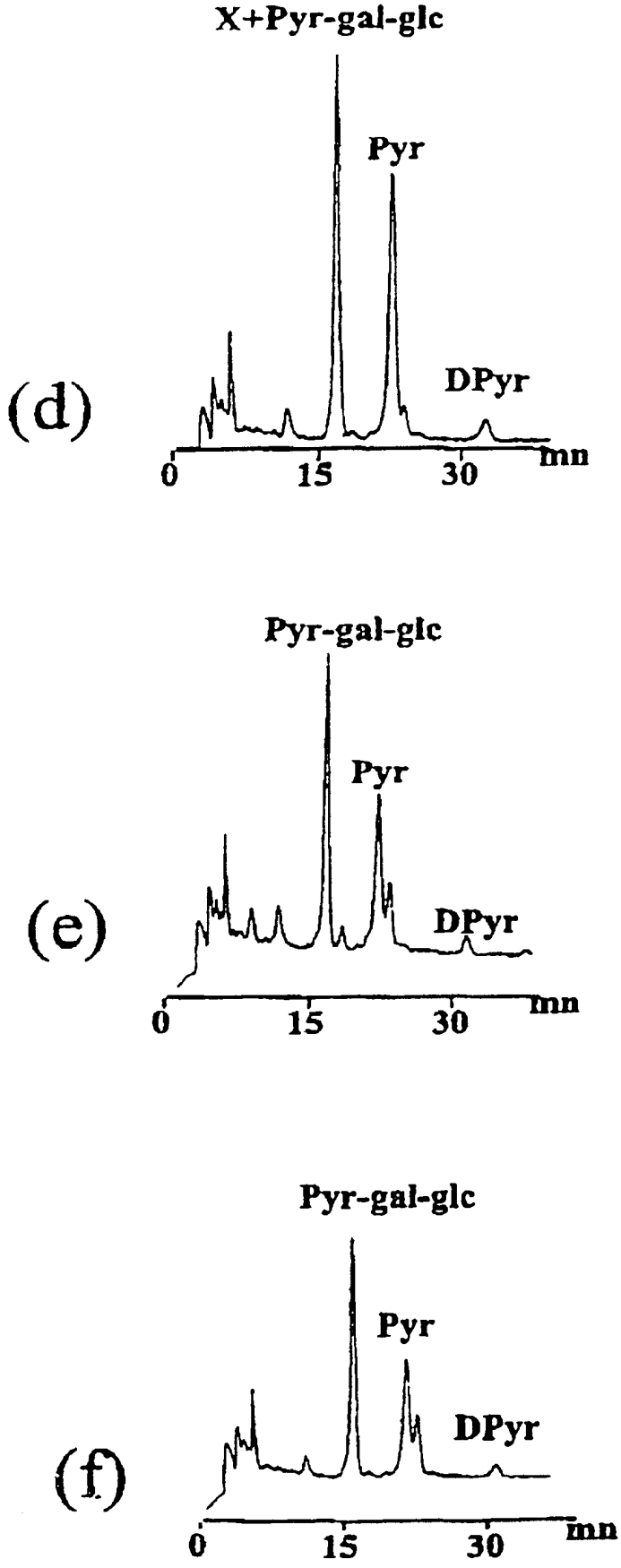

X+Pyr-gal-glc
Pyr
DPyr
(d)
0
15
30
mn
Pyr-gal-glc
Pyr
DPyr
(e)
0
15
30
mn
Pyr-gal-glc
Pyr
DPyr
(f)
0
15
30
mn

FIG. 7 B

			Pyr total (nmol/mmol Cr)		Pyr libre (nmol/mmol Cr)			(nmol/mmol Cr)	
Individuos	n	edad	Pyr	D-Pyr	Pyr	D-Pyr	Pyr-Gal-Glc	CartiLaps	CrossLaps
Mujeres premenopáusicas	20	35,7 ± 2,8	28,5 ± 4,1	5,9 ± 1,4	13,4 ± 2,7	3,3 ± 0,9	4,5 ± 1,0	6,2 ± 0,9	126 ± 27
Mujeres postmenopáusicas	20	55,3 ± 2,4	34,8 ± 9,5	7,6 ± 2,6	15,6 ± 3,7	3,7 ± 0,9	4,8 ± 1,7	7,5 ± 2,8	281 ± 100
Controles	40	45,5 ± 10,3	31,6 ± 7,9	6,7 ± 2,2	14,5 ± 3,4	3,5 ± 0,9	4,7 ± 1,4	6,9 ± 2,2	203 ± 106
Poliartritis reumatoide	27	56,2 ± 11,9*	72,2 ± 51,8*	10,8 ± 7,6*	26,3 ± 15,0*	4,0 ± 2,3	9,6 ± 5,9*	12,4 ± 8,5*	266 ± 187
Enfermedad de Paget	10		125,8 ± 53,6*	31,2 ± 13,5*	42,1 ± 15,4*	10,2 ± 5,1*	6,1 ± 1,9	7,2 ± 2,9	834 ± 352*

* Significación estadística (Anova) $p<0,05$ de la diferencia comparada con el grupo testigo

FIG. 8

ES 2 304 351 T3

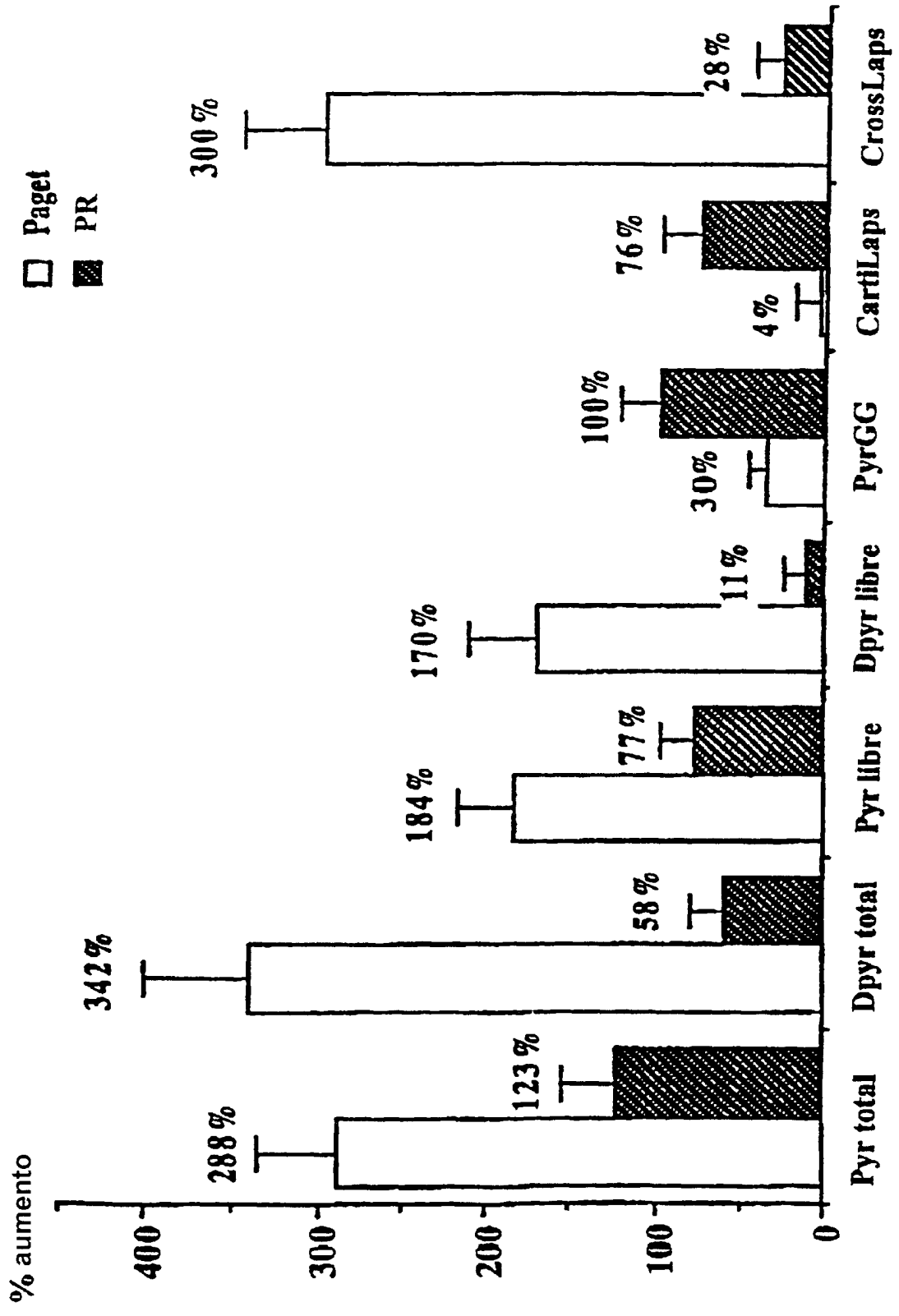

Paget
PR
% aumento
400
300
200
100
0
288 %
342 %
123 %
58 %
184 %
77 %
170 %
11 %
30 %
100 %
4 %
76 %
300 %
28 %
Pyr total
Dpyr total
Pyr libre
Dpyr libre
PyrGG
CartiLaps
CrossLaps

FIG. 9

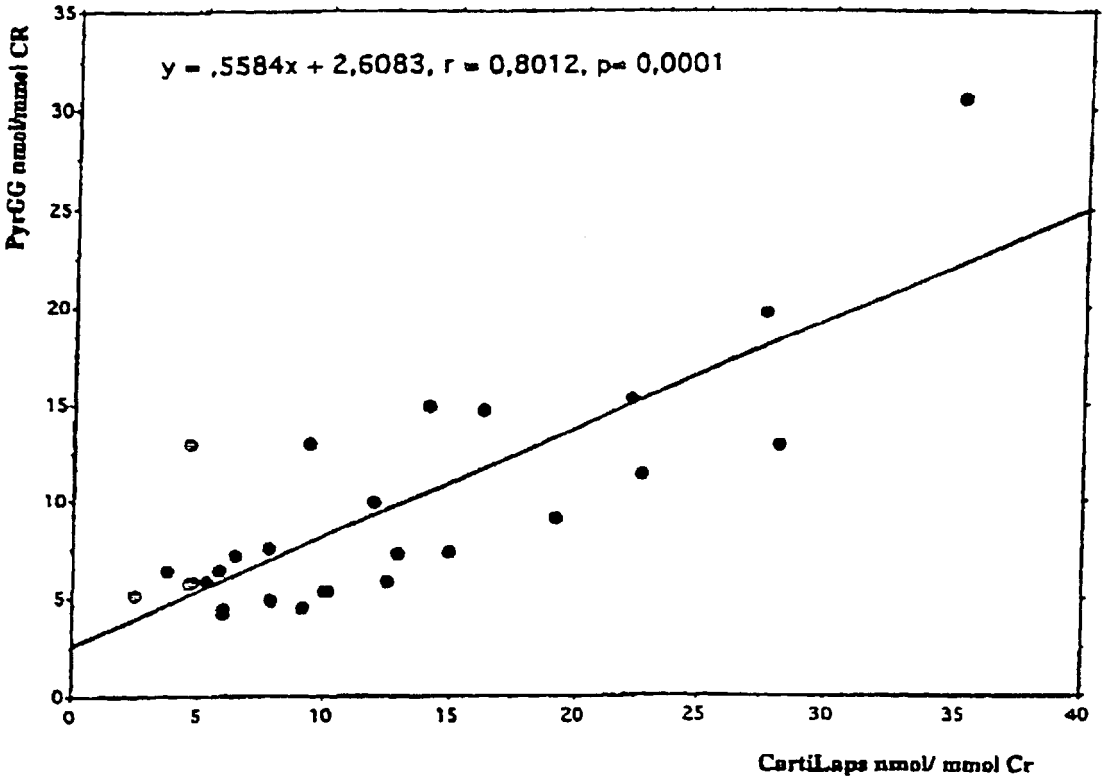

y = ,5584x + 2,6083, r = 0,8012, p= 0,0001
PyrGG nmol/mmol CR
CartiLaps nmol/ mmol Cr
0
5
10
15
20
25
30
35
40

FIG. 10

	n	Pyr-Gal-Glc (nmol/mmol Cr)	CartiLaps (nmol/mmol Cr)
Controles	40	4,7 ± 1,4	6,9 ± 2,2
Poliartritis reumatoide (PR)	27	9,6 ± 5,9*	12,4 ± 8,5*
PR destructivas	12	12,2 ± 7,4*	16,5 ± 10,0*
PR no destructivas	15	7,5 ± 3,2*	9,2 ± 5,4**

* Significado estadístico (prueba T) p<0,001

** Significado estadístico (prueba T) p<0,05

FIG. 11

	Lequesne	Womac	espacio tibio femoral
Pyr-gal-glc	0,42*	0,50*	0,50*

* p<0,01

FIG. 12

	Estrechamiento de la interlínea articular		Erosión ósea		Resultado total	
Progresión	SÍ (n=27)	NO (n=84)	SÍ (n=41)	NO (n=70)	SÍ (n=54)	NO (n=57)
Pyr-Gal-Glc urinaria (nmol/mmol creatinina)	8,8	7,2	9,3*	6,5	8,8**	6,3

Significado estadístico de la diferencia comparada con el grupo sin progresión *p=0,003, **p=0,005

FIG. 13

ES 2 304 351 T3