



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 127**

51 Int. Cl.:

A61K 38/52 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 14/46 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00920987 .5**

86 Fecha de presentación : **21.04.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1171157**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2002**

54 Título: **Utilización de la glucosa-6-fosfato isomerasa y de sus anticuerpos para el diagnóstico y la terapia de la artritis, y el ensayo de compuestos antiartríticos.**

30 Prioridad: **22.04.1999 US 130730 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es: **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Benoist, Christophe;
Matsumoto, Isao;
Korganow, Anne-Sophie;
Mathis, Diane;
Maccioni, Mariana y
Ji Hong**

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).

DESCRIPCIÓN

Utilización de la glucosa-6-fosfato isomerasa y de sus anticuerpos para el diagnóstico y la terapia de la artritis, y el ensayo de compuestos antiartríticos.

La presente invención se refiere a la utilización de anticuerpos contra la proteína glucosa-6-fosfato isomerasa para el diagnóstico de la artritis y a la utilización de dicha proteína para el tratamiento de la artritis.

La artritis reumatoidea (RA) es un trastorno autoinmune incapacitante y frecuente (Feldmann *et al.*, 1996). Es una enfermedad crónica y progresiva de las articulaciones, caracterizada por la invasión leucocitaria de la cubierta sinovial y la hiperplasia de los sinoviocitos residentes. La superproducción que sigue de las citoquinas y de otros mediadores solubles da lugar a la destrucción del cartílago, a la erosión ósea y a la remodelación anárquica de las estructuras articulares. La etiología y la patogénesis de la RA siguen siendo polémicas. No se sabe si la enfermedad se inicia por una reacción inflamatoria moderada a un antígeno microbiano (Ag), a una respuesta autoinmune inapropiada a un constituyente propio, o a ambas. Se ha postulado y discutido un papel importante para las células T (Panayi *et al.*, 1992), las células B (Zvaifler, 1973), y otros leucocitos tales como las células dendríticas, los macrófagos y los neutrófilos (Thomas y Lipsky, 1996). La falta de consenso refleja en gran parte dos factores. La RA es un síndrome heterogéneo, en el que pacientes distintos muestran ampliamente edades diferentes de inicio, curso de la enfermedad, perfiles genéticos y respuestas a la intervención terapéutica. Además, ha existido escasez de modelos de la RA de animales pequeños, particularmente de los que sucumben espontáneamente a la enfermedad.

Recientemente, los presentes inventores generaron un nuevo modelo de artritis de ratón transgénico que desarrolla espontáneamente una enfermedad con muchas de las características de la artritis reumatoidea humana ((Kouskoff *et al.*, 1996), patente US nº 5.675.060). Todos los ratones transgénicos (tg) con células KRN T receptoras en los progenitores genéticos C57B1/6xNOD (que se abrevian en la presente memoria en adelante como ratones K/BxN) desarrollaron un trastorno articular, que se inició entre las tres y cuatro semanas de edad y que evolucionó rápidamente hasta que la movilidad del animal se vio gravemente comprometida; como en los pacientes, la enfermedad es crónica, progresiva simétrica y presenta una gradación entre leve y severa. La enfermedad murina muestra todas las características histológicas importantes de la humana: invasión de leucocitos, sinovitis, formación de tejido de granulación sinovial, destrucción del cartílago y del hueso, remodelación anárquica. El modelo de ratón, como los pacientes, muestra varias anormalidades inmunológicas, que incluyen la hiperactividad de las células B que se manifiesta como un aumento en el número de células B, hipergammaglobulinemia y producción de auto-anticuerpos.

En los ratones K/BxN se inicia la enfermedad por el reconocimiento mediante reacción cruzada de las moléculas A^{g7} NOD-derivadas del Complejo Principal de Histocompatibilidad por KRN TCR. Así, en los animales K/BxN, se genera una situación de autoreactividad sistémica, que explica cómo se desarrolla la enfermedad autoinmune específica de las articulaciones en presencia de dicha autoreactividad. Se informa anteriormente de que los linfocitos T son necesarios para el desarrollo de la artritis, y que el bloqueo de linfocitos T evita la enfermedad, aunque parecen prescindibles en los estadios más avanzados de la enfermedad. Los linfocitos B son asimismo críticos (Kouskoff *et al.*, 1996).

En la presente invención, se descubre que las células B son necesarias para la artritis espontánea, porque producen inmunoglobulinas patogénicas dirigidas contra una diana que se identifica como glucosa-6-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.9). Se muestra que la glucosa-6-fosfato isomerasa recombinante puede utilizarse como ensayo diagnóstico de la artritis murina, y adsorber inmunoglobulinas patogénicas.

En modelos animales, se ha informado previamente de autoanticuerpos en situaciones de artritis inducida, cuando la enfermedad es inducida por inmunización con componentes del cartílago, tales como el colágeno de tipo II. No se ha encontrado previamente que los anticuerpos contra las proteínas que se expresan ubicuamente sean artritogénicos.

Los autoanticuerpos se encuentran asimismo en el suero de los pacientes RA, y tienen algún valor diagnóstico. El factor reumatoide (RF; Ab contra la porción Fc de IgG) se ha considerado como una característica de esta enfermedad; sin embargo, no se encuentra en aproximadamente el 30% de los pacientes RA y se encuentra en los individuos con otras enfermedades autoinmunes (Mannik, 1992; Rudolphi *et al.*, 1997) o en situación de estimulación inmune crónica. Abs contra el cartílago o los componentes epidérmicos se han detectado asimismo en los pacientes RA, dirigidos contra el colágeno de tipo II (cII) o la filagrina, por ejemplo, pero, otra vez, éstos muestran generalmente una correlación limitada con los parámetros de la enfermedad (Rudolphi *et al.*, 1997; Claque y Moore, 1984; Sebbag *et al.*, 1995). Conrad, U *et al* (Biochem. Genet., 1987, 25 (2-10), 739-54), describe anticuerpos monoclonales dirigidos contra la GPI.

La presente invención se refiere a anticuerpos contra la glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI).

Dichos anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales y las tecnologías utilizadas para su preparación son conocidas por el experto en la materia.

La invención se refiere asimismo a la utilización de la proteína GPI y de sus anticuerpos para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la artritis y para el diagnóstico *in vitro* de la artritis.

Los anticuerpos según la invención son distintos de los anticuerpos artitrogénicos que se describen en la técnica anterior, que se dirigen contra los componentes del cartílago tales como un colágeno de tipo II. Los anticuerpos de la presente invención se dirigen principalmente contra proteínas, que se expresan en muchos tejidos no articulares, pero que se liberan en el suero.

Otra forma de realización de la presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de la artritis, que comprende la detección de autoanticuerpos contra la proteína GPI en la muestra del plasma o del suero de un paciente.

El procedimiento para ensayar la presencia o la cantidad de anticuerpos contra la proteína GPI que se encuentra en una muestra comprende la unión de dichas proteínas a los anticuerpos en la muestra y la detección de los anticuerpos unidos a dichas proteínas.

Los procedimientos para la detección de anticuerpos en el plasma o suero son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, los ensayos ELISA o RIA. Es posible utilizar un sustrato revestido con GPI, por ejemplo, una placa de ensayo, y detectar entonces la presencia de anticuerpos fijados a dicha GPI con anticuerpos marcados adecuados. Entre los marcadores, los que son preferidos son isótopos radioactivos, compuestos que contienen un isótopo, enzimas, en particular las enzimas que son susceptibles a reaccionar con cromógenos, fluorógenos o luminiscentes (por ejemplo, una peroxidasa o una fosfatasa alcalina), cromóforos, compuestos cromógenos, fluorógenos o luminiscentes, análogos básicos y ligandos, tales como la biotina.

Según la presente invención, la proteína GPI puede ser la misma proteína natural, la proteína recombinante, la proteína sintética o sólo el epítipo recombinante de dicha proteína. Así, la presente invención se refiere asimismo a un equipo para llevar a cabo el diagnóstico de los anticuerpos contra la proteína GPI, que comprende un agente diagnóstico constituido por una proteína que es GPI, o un epítipo suyo, capaz de interactuar con un autoanticuerpo del plasma o del suero, y un segundo anticuerpo capaz de unirse a dicho autoanticuerpo, marcándose dicho segundo anticuerpo para la detección.

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a la utilización de la proteína GPI, que es capaz de interactuar con autoanticuerpos para inhibir o eliminar dichos autoanticuerpos, para tratar o prevenir la artritis.

La invención se refiere asimismo a la expresión de la proteína GPI *in vivo*, utilizando un vector que comprende elementos suficientes para expresar *in vivo* dicha GPI. Dicho vector puede ser de origen vírico, puede ser un plásmido o puede ser puramente sintético o ADN desnudo, tal como se describe en la tecnología VICAL. La expresión de dichas proteínas proporcionará proteína GPI para adsorber anticuerpos artritogénicos (véanse los ejemplos de dicha especificación).

La eficacia de las composiciones anti-artríticas potenciales puede evaluarse determinando el efecto de las composiciones sobre la artritis inducida en ratones normales mediante la inyección de suero de los ratones K/BxN, o de las inmunoglobulinas de que se derivan de éstos, o de los anticuerpos anti-GPI. Las composiciones así evaluadas incluyen, pero no se limitan a: compuestos químicos, compuestos biológicos tales como anticuerpos, polipéptidos, agentes anti-inflamatorios, hormonas, tolerígenos, que inhiben la unión de anticuerpos anti-GPI a sus dianas, o las consecuencias patológicas de esta unión.

Esto puede llevarse a cabo: i) administrando una dosis conocida de suero artritogénico o inmunoglobulinas a un primer ratón no artrítico, recibiendo asimismo dicho animal la composición artritogénica que va a ensayarse, administrada antes, conjuntamente con, o después del suero artritogénico o de las inmunoglobulinas; ii) detectando el curso de la inflamación a lo largo del tiempo y la destrucción articular en dicho primer ratón; e iii) comparando el curso de la inflamación a lo largo del tiempo y la destrucción articular en dicho primer ratón, con el curso de la inflamación a lo largo del tiempo y la destrucción articular en un segundo ratón del mismo genotipo que reciba el mismo suero artritogénico o las mismas inmunoglobulinas, pero que no ha sido expuesto a dicha composición anti-artrítica.

Otra posibilidad para la etapa ii) es detectar el grado de inflamación, la destrucción de las articulaciones y la deformación de los miembros en dicho primer ratón; y para la etapa iii) comparar el grado de inflamación, la destrucción de las articulaciones y la deformación de los miembros en un segundo ratón del mismo genotipo que recibe el mismo suero artritogénico o las mismas inmunoglobulinas, pero que no se ha expuesto a dicha composición anti-artrítica.

En este procedimiento, las inmunoglobulinas artritogénicas pueden ser anticuerpos monoclonales o sus combinaciones, especialmente los anticuerpos que se describen a continuación.

Asimismo, es posible ensayar moléculas que sean capaces de modular la producción de GPI para tratar la artritis, pudiendo ser dichas moléculas, por ejemplo, anticuerpos que no son patogénicos.

Asimismo, es posible utilizar superficies revestidas con la proteína GPI para el tratamiento del suero en un circuito extracorpóreo para eliminar las cantidades de anticuerpos patológicos.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para aislar anticuerpos monoclonales capaces de transferir la artritis, que comprende las etapas siguientes:

ES 2 269 127 T3

- a) preparar hibridomas a partir de linfocitos de esplenocitos de mamíferos artríticos, preferentemente a partir de esplenocitos K/BxN del ratón,
- b) seleccionar dichos hibridomas en condiciones de dilución limitada en un medio HAT,
- c) rastrear hibridomas que produzcan anticuerpos dirigidos contra la proteína GPI en un ensayo ELISA,
- d) expansión y clonación de los hibridomas seleccionados en la etapa c),
- e) ensayo de dichos anticuerpos producidos por hibridomas seleccionados en la etapa d), en combinación o solos, respecto a su capacidad para transferir la artritis.

El ensayo de la etapa e) puede obtenerse i): administrando una dosis conocida de dichos anticuerpos a un ratón normal; ii) detectando el comienzo de la destrucción de las articulaciones y la deformación de los miembros por inflamación en dicho ratón.

Debe entenderse que las etapas del procedimiento anteriores pueden alcanzarse con procedimientos bien conocidos que pertenecen a la técnica, y que no están limitadas a ningún procedimiento en particular.

Por tanto, la invención se refiere a anticuerpos monoclonales que pueden obtenerse mediante dicho procedimiento y a progenies de hibridomas que produzcan dichos anticuerpos. Entre los anticuerpos que se muestran en el ejemplo 5, se prefieren los anticuerpos 2.99 y 6.121 (véase la figura 9 a continuación). Estos anticuerpos pueden utilizarse hasta los mismos extremos que el suero o las inmunoglobulinas anti-GPI que se han descrito anteriormente.

Algunas características y ventajas adicionales de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de los ejemplos siguientes, que se explicarán haciendo referencia a las figuras, en las que,

Figura 1

El Suero de ratones K/BxN puede transferir la artritis

A: Patas de ratones normales a los que se inyectó 72 horas antes con 150 μ l de suero de un ratón artrítico K/BxN, o a partir de una camada no artrítica de control (ctl). Se aprecia que la inflamación y el enrojecimiento en el ratón inyectado con el suero artrítico. La artritis puede objetivarse mediante mediciones del espesor del tobillo o de la evaluación del índice clínico (cuadros a la derecha); la clasificación clínica se define como: 0, normal; 1, dudoso; 2, dos patas afectadas; 3, tres patas afectadas; 4, todos los miembros afectados.

B: La patología inducida por la transferencia de suero se encuentra en todos los receptores, sean o no transgénicos, pero es más intensa en los receptores que poseen células T autorreactivas pero que no pueden desarrollar la artritis por falta de las células B (K/BxN- μ M^{0/0})

C: Disminución de la artritis, considerada como índice clínico, después de un corto tiempo de administración del suero K/BxN (puntos abiertos), pero persistencia después de inyecciones repetidas (puntos negros).

D: Actividad artritogénica de la fracción IgG del suero. Cuadro izquierdo: ratones RAG^{0/0} se inyectaron con cantidades similares (relativas a los volúmenes de inicio) de suero de ratones artríticos K/BxN (estrellas), eluyéndose la fracción o el flujo a su través (cruzamientos) a partir de una columna de proteína G (círculos cerrados). Cuadro derecho; el doble de la cantidad de IgG de las camadas tg no TCR fue incapaz de inducir la artritis.

Figura 2

Suero de ratones K/BxN pueden transferir la artritis

Cortes de la rodilla de un ratón típico K/BxN (a la izquierda) o de un ratón normal 10 días después de dos inyecciones de 200 μ l de suero de un animal artrítico K/BxN (a la derecha). Se aprecia en ambos casos el engrosamiento de la cubierta sinovial, la infiltración inflamatoria masiva subyacente, que se extiende sobre el cartílago y comienza su destrucción, y la presencia de células polimorfonucleares en la cavidad articular. Tinción con hematoxilina y eosina (H+E), Aumento del objetivo de 10x.

Figura 3

Una proteína de 60 kD es la diana más importante de los autoanticuerpos K/BxN

Los extractos de proteínas totales (extracción NP-40) del tobillo (A), bazo (S) o riñón (K) se procesaron sobre SDS-PAGE, se transfirieron mediante electrotransferencia, y se sondearon con suero procedente de un ratón artrítico K/BxN o de una camada de control. Se indica la posición de la banda prominente de 60 kD. kD.

Figura 4

La proteína de 60 kD diana del suero K/BxN es la glucosa-6-fosfato isomerasa

5 La proteína de 60 kD de los extractos renales se inmunopurificó sobre inmunoabsorbentes preparados con inmunoglobulinas K/BxN. Después de digestión con tripsina, los péptidos se purificaron mediante HPLC, y varios se secuenciaron mediante la degradación de Edman automatizada. Las tres secuencias peptídicas obtenidas pertenecen a la glucosa-6-fosfato isomerasa, y están subrayadas. Para confirmar a continuación esta identificación, se determinó el peso molecular de un cuarto péptido mediante espectrometría de masas, y coincide perfectamente con la masa de un
10 fragmento triptico de GPI (subrayado ondulado).

Figura 5

Suero artrítico se une a la GPI recombinante

15 Se llevó a cabo una transferencia Western como en la Figura 3, excepto en que la proteína que se cargó fue GPI recombinante producida en *E. coli* (como una proteína de fusión con GST). Las transferencias (borrones) se sondearon con el suero procedente de un K/BxN artrítico o de un ratón de control.

Figura 6

El ensayo ELISA detecta anticuerpos anti-GPI en los sueros de ratones artríticos, pero no en los controles

25 En este inmunoensayo enzimático, la GPI recombinante, producida como anteriormente, se utilizó para revestir los pocillos de las placas ELISA. Éstas se utilizaron para ensayar la IgG anti-GPI en los sueros de los ratones artríticos o de control. Los valores que se muestran en la presente memoria se obtuvieron con diluciones séricas de 1/16.000, pero se pudieron obtener señales positivas todavía con diluciones tales como de 1/1.000.000. El único ratón artrítico negativo en el ensayo fue un animal que se convirtió en artrítico el día en el que se había tomado la muestra sérica.
30

Figura 7

Suero de ratones K/BxN puede transferir la artritis

35 A: la GPI recombinante, o la proteína recombinante de control -GST sola-, producida como anteriormente, se unió a un soporte sólido, y se utilizó como un inmunoabsorbente para eliminar anticuerpos anti-GPI a partir del suero K/BxN. Toda la IgG anti-GPI se encontraba en la fracción unida, tal como se esperaba. La capacidad para transferir la artritis se encontró solamente en la fracción unida, y se eliminó de la fracción que fluía a través de la columna.

40 B: Un experimento representativo, en el que los ratones normales se inyectaron con varias fracciones del esquema de purificación que se muestra en A. LA artritis se evaluó y se clasificó como anteriormente.

Figura 8

45 *La transferencia del suero K/BxN puede servir de ensayo del potencial terapéutico de un tratamiento con anticuerpos monoclonales*

50 Ratones inocentes de 4 semanas de edad de la cepa C57B1/6 se inyectaron con 200 μ l de un suero común de ratones K/BxN en los días 0 y 3. A los ratones se les inyectó asimismo con el anticuerpo de prueba BB5.1, que bloquea el factor C5 de complemento, en los días -2, -1, +1, +5 y +8, o con sólo un vehículo. El inicio de la artritis fue seguido por la medición del grosor del tobillo en los días siguientes. Los ratones tratados con los anticuerpos monoclonales quedaron protegidos de la artritis, mientras que a los que se inyectó con sólo el vehículo presentaron la enfermedad.
55

Figura 9

Los anticuerpos monoclonales anti-GPI inducen la artritis cuando se inyectan conjuntamente en los ratones inocentes

60 Ratones inocentes de 4 semanas de edad de la cepa Balb/c se inyectaron con 1 ml de IgG purificada de los mAbs 6.121 y 2.99 anti-GPI disueltos en solución tamponada salina, o con 1 mg de cada uno de ellos, en los días 0 y 3. El inicio de la artritis fue seguido por la medición del grosor del tobillo en los días siguientes. Los ratones tratados con los dos anticuerpos monoclonales en combinación, mostraron artritis, pero no así los inyectados con mAb sólo.
65

Ejemplo 1

Inmunoglobulinas median la artritis KRN

5 Se mostró ((Kouskoff *et al.*, 1996), patente US n° 5.675.060) que los ratones que transportan todos los elementos genéticos necesarios para que aparezca la artritis KRN, pero son deficientes en linfocitos B, están libres de la enfermedad. Para explorar la posibilidad de que el desarrollo de la artritis en el modelo KRN dependa críticamente de un producto particular de las células B, se trata de provocar la enfermedad en los ratones no artríticos transfiriendo suero de los ratones K/BxN. Apareció una inflamación grave de las articulaciones en los animales a los que se había
 10 inyectado con el suero de los donadores artríticos K/BxN, pero no en los que recibieron suero de los controles BxN no artríticos (Fig 1A). La enfermedad podría haberse inducido con una cantidad tan pequeña como 100 μ l de suero de K/BxN, mostrando capacidad de reproducción. Se provocó muy rápidamente, medida mediante la clasificación clínica o el grosor del tobillo, siendo evidente ya a los dos días después de la inyección sérica. La artritis pudo obtenerse después de inyectar suero procedente de los donantes artríticos en ratones normales, en huéspedes RAG^{0/0} deficientes
 15 en linfocitos, o en ratones K/BxN deficientes en células B (ratones K/BxN- μ MT⁰⁰) (Fig 1B). Estos resultados muestran que los componentes séricos de los ratones K/BxN son suficientes para conferir la artritis, aunque la enfermedad más agresiva que se apreció con los últimos animales indica que las células T K/BxN juegan probablemente un papel accesorio de potenciación en la fase efectora.

20 La artritis provocada por la transferencia sérica presenta todas las características histológicas de la enfermedad en los ratones K/BxN habituales, incluyendo la invasión de las células inflamatorias, la hiperplasia de los sinoviocitos, la formación del tejido sinovial de granulación, y la destrucción del cartílago (Fig 2A y B).

La artritis inducida por la inyección sérica es transitoria. En los ratones que habían recibido un par único de inyecciones, la inflamación de las articulaciones empezó a decrecer después de aproximadamente 15 días (Fig 1C); después de 30 días, algunas de las articulaciones aparecían completamente normales, incluso en los animales que inicialmente se habían mostrado totalmente artríticos. La fugacidad de la enfermedad pudo superarse mediante inyecciones repetidas del suero de los ratones artríticos (Fig 1C). Que esto fuera verdad incluso para los receptores RAG^{0/0} sugiere que la inestabilidad del compuesto sérico es la explicación de la naturaleza transitoria de la enfermedad.

30 El factor sérico artritogénico es una inmunoglobulina (Ig) producida por las células B: después del fraccionamiento del suero de los ratones K/BxN en componentes IgG y no IgG, sólo la fracción IgG es capaz de provocar la artritis en los huéspedes RAG^{0/0}: su potencia es similar a la del suero completo (respecto al volumen de inicio) (Fig 1D), como son las características histológicas de la enfermedad que indujo (datos no representados).

Ejemplo 2

Diana molecular de las inmunoglobulinas patogénicas

40 De esta manera, una Ig producida por los linfocitos B es clave para el desarrollo de la artritis en los ratones K/BxN. Se intenta entonces definir sus dianas moleculares. Al principio, se podría haber imaginado que éstas podrían ser anticuerpos dirigidos contra componentes específicos de la articulación, generados de alguna forma por la interacción de las células transgénicas T reactivas contra la molécula Ag7 en la superficie de las células B; esto podría prevenir la tolerancia normal de las células B respecto a los componentes propios, o inducir la estimulación de las
 45 células B policlonales y la síntesis de Ig reactiva contra componentes propios (quizás poliméricos). Encaramos el asunto:

1) Mediante análisis inmunohistoquímico de los ratones RAG^{0/0} después de transferir Ig de los ratones K/BxN. Estos análisis mostraron el depósito de la Ig transferida no sólo en el tejido sinovial de la articulación, sino también en
 50 las membranas de revestimiento de muchos o otros órganos (bazo, riñón, hígado, músculo; datos que no se muestran).

2) Mediante análisis de transferencia Western; se prepararon extractos proteicos enteros de la articulación del tobillo y de varios otros órganos de los ratones RAG^{0/0} (para evitar la presencia de Ig en el extracto), se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE), se sometieron a transferencia, y se sondearon
 55 con suero de ratones K/BxN. La unión de Ig se reveló mediante sondeo con IgG anti-conejo conjugada con HRP. Como se puede apreciar en la Fig 3, se pudo detectar una única banda proteica dominante en estas transferencias, con PM de aproximadamente 60 kD. Esta banda se apreció repetidamente cuando se utilizaron los sueros de diversos ratones artríticos K/BxN, pero no con sueros procedentes de camadas no artríticas de control. Otras proteínas se detectaron con algunos de los sueros, pero de forma inconsistente y siempre fueron más débiles que la banda de
 60 60 kD.

Se intentó entonces identificar esta proteína de 60 kD. Con este fin, la IgG de un amplio conjunto de sueros K/BxN se purificó mediante cromatografía de afinidad en columnas de Proteína G. Esta Ig purificada (1,5 mg) se unió covalentemente a Sepharosa activada por CNBr. Esta matriz se utilizó entonces como un inmunoabsorbente
 65 sobre el cual se cargaron 50 mg de extracto NP-40 del riñón de ratones RAG^{0/0}. La columna se lavó a fondo, y las proteínas unidas se eluyeron a un pH ácido. Se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción Coomassie. Tal como se esperaba de los resultados descritos anteriormente, se apreció una banda dominante de 60 kD. Esta banda se extirpó, se sometió a digestión la proteína en la rebanada de gel mediante tripsina, tal como se describe en (Ro-

senfeld *et al.*, 1992) y los péptidos resultantes se resolvieron mediante HPLC de fase inversa. Se identificaron varios péptidos. Tres de ellos se secuenciaron entonces mediante la degradación de Edman automatizada en un instrumento 470 A de Applied Biosystems. Las secuencias se compararon a las bases de datos públicas, utilizando el programa BLAST en la base de datos Swissprot. Se encontró que los tres pertenecían a la proteína glucosa-6-fosfato isomerasa (*aka* fosfohexosa-isomerasa; EC 5.3.1.9; número P06745 de la base de datos Swissprot; número de registro de la secuencia nº 1230741; que se abrevia en la presente memoria como GPI). Sus posiciones se muestran en la Fig 4. Otro de los péptidos obtenido se encontró asimismo que pertenecía a GPI, basándose en el análisis de espectrometría de masas que coincidió exactamente con el peso molecular predicho a partir de la secuencia (Fig 4).

El peso molecular de GPI (62636 kD) concuerda mucho con el PM de la diana del suero K/BxN predicho a partir de las transferencias Western, atendiendo a la precisión de la estimación del PM mediante PAGE.

GPI constituye una enzima esencial de la vía glicolítica. Es una enzima que se expresa en esencialmente todos los tejidos, tanto normales como tumorales, con algunas variaciones cuantitativas, desde los estadios más tempranos de la embriogénesis hasta el final en la vida de los animales (West *et al.*, 1990; Hallbook *et al.*, 1989; Warner *et al.*, 1985). Es normalmente una enzima citoplásmica, pero la GPI soluble puede encontrarse en el suero; se encuentra elevada en los pacientes tumorales (órganos varios), pero no de forma que haga de ella un marcador fidedigno (véase por ejemplo (Neri *et al.*, 1983; Schwemmer *et al.*, 1985; Paulick *et al.*, 1987; Gomm *et al.*, 1988; Gurney *et al.*, 1986)). GPI se ha purificado asimismo independientemente como “Neuroleuquina”, “factor de maduración”, o “Factor Autocrino de Motilidad”, factores secretados de a menudo una potencia limitada como agente neurotrófico, o como agentes que promueven la migración celular o la diferenciación de las células tumorales (Gurney *et al.*, 1986; Faik *et al.*, 1988; Niinaka *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1996). Las deficiencias genéticas en GPI dan lugar a síndromes de anemia hemolítica (véase por ejemplo (Kanno *et al.*, 1996; Baronciani *et al.*, 1996)).

Para confirmar que GPI es la proteína reconocida por las Ig que se encuentran en el suero K/BxN, producimos GPI recombinante en *E. coli*. La secuencia codificante de la GPI murina se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa, y el producto se clonó en el plásmido pGEx-4T-3 (Pharmacia). La proteína recombinante, un producto de fusión con Glutación-S-transferasa, se purificó mediante cromatografía de afinidad en una columna de Glutación-Sephara 4B. El producto se caracterizó sobre SDS-PAGE, y mostró el tamaño esperado (datos no representados). El gel se sometió a transferencia, y las tiras se sondearon con suero procedente de K/BxN o de controles de camadas no transgénicas. Como puede apreciarse en la Fig 5, todos los sueros K/BxN reaccionaron intensamente, mientras que los sueros de control fueron negativos, confirmando que la proteína GPI es la diana molecular de los anticuerpos anti-60 kD en el suero K/BxN.

La proteína recombinante se utilizó asimismo en los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para detectar la reactividad a la GPI en los sueros de ratones K/BxN de distintas edades. Como se describió anteriormente (Kouskoff *et al.*, 1996), la artritis KRN aparece entre los 28 y 32 días de edad. Como se muestra en la Fig 6, el ensayo detectó una reactividad significativa superior a la anterior, hasta diluciones de 1/20.000, en sueros de los ratones K/BxN. No se apreció dicha reactividad en las camadas de control. El ensayo puede, por tanto, servir como un buen ensayo diagnóstico de la artritis en estos ratones.

Ejemplo 3

Los anticuerpos anti-GPI son las inmunoglobulinas patogénicas

¿Constituyen los anticuerpos anti-GPI todas las especificidades patogénicas del suero K/BxN, y puede su eliminación eliminar el potencial patogénico del suero? Para considerar esta cuestión, se unen 5 mg de GPI recombinante o de la proteína GST de control, preparadas como se ha explicado anteriormente, con Sephara conjugada a CNBr. Se aplicaron secuencialmente a estas columnas conjuntos de sueros de los ratones K/BxN. Las proteínas unidas se eluyeron con pH ácido, y se ensayaron mediante transferencia a ratones inocentes, junto con una alícuota del material de inicio y de fracciones de flujo a su través. Como se aprecia en la Fig 7, toda la actividad artritogénica se encontró en la fracción unida a la columna conjugada a GPI, y ninguna de las correspondientes al flujo a su través, incluso las últimas, contenía la mayor parte de la in inmunoglobulina. Estos resultados demuestran que los anticuerpos anti-GPI constituyen verdaderamente la Ig patogénica en el suero de los ratones artríticos K/BxN, y que pueden adsorberse con la proteína GPI recombinante.

A partir de estos datos, se concluye que los anticuerpos anti-GPI producidos en los ratones transgénicos, provocan artritis. Se descubrió (datos no publicados) que las células T que expresan el receptor KRN son estimuladas específicamente por células presentadoras de antígenos expuestas al antígeno GPI. Estas células T a su vez estimulan a las células B que producen inmunoglobulinas anti-GPI, que internalizan efectivamente a GPI y reciben de esta forma ayuda de las células T más fácilmente que las células B no específicas (Lanzavecchia, 1985). Se propone, pues, que las células T auto reactivas contra GPI o las proteínas relacionadas circulantes, que se encuentran en cantidades limitadas en la circulación y son pues incapaces de inducir una tolerancia que paralice el sistema inmune, podrían inducir anticuerpos artritogénicos similares en condiciones humanas como RA.

Ejemplo 4

La transferencia de suero desde los K/BxN artríticos ofrece un modelo en el que pueden ensayarse formulaciones antiartríticas potenciales mediante administración concomitante con el suero artritogénico o las inmunoglobulinas.

Como ejemplo, se probó la capacidad del anticuerpo monoclonal anti-c5 para interferir con la artritogénesis en el modelo K/BxN. Se seleccionó este reactivo a causa de la evidencia primaria que implica a los componentes del complemento, y en particular a C5, en la generación de lesiones articulares en otros modelos murinos de artritis y en los pacientes RA humanos (Watson *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1995). Se inyectó a los ratones con suero artritogénico procedente de ratones K/BxN, y al mismo tiempo que el anticuerpo monoclonal BB5.1 anti-c5, conocido por bloquear la actividad de C5 (Frei *et al.*, 1987) Como puede apreciarse en la Fig 8, los ratones a los que se inyectó el anticuerpo monoclonal anti-c5, se protegieron de la enfermedad.

Ejemplo 5

Si las inmunoglobulinas que se encuentran en el suero de los ratones K/BxN pueden transferir la artritis, se podrán aislar asimismo anticuerpos (mAbs) que sean capaces asimismo de transferir la enfermedad a los receptores inocentes. Esplenocitos procedentes de ratones K/BxN de 30 y 50 días de edad se fusionaron según los protocolos estándar para la obtención de hibridomas (St Groth y Scheidegger, 1980), seleccionándose los hibridomas en medio HAT, en condiciones de dilución limitante, en placas de 96 pocillos. Los híbridos se rastrearon respecto a la producción de inmunoglobulinas reactivas para GPI, ensayando los sobrenadantes de los cultivos en un ensayo ELISA con GPI recombinante como un antígeno unido y una IgG antirratón como un reactivo de revelado. Se seleccionaron varios pocillos positivos respecto a la expansión, clonando mediante dilución limitante y ensayando la estabilidad de las progenies de hibridoma. Se obtuvieron de este modo once progenies estables de hibridoma que producían IgG anti-GPI (véase la Tabla 1 a continuación)

TABLA 1

Anticuerpos monoclonales anti-GPI

Anticuerpo monoclonal	Péptido reconocido	Isotipo
1,8	277-312	IgG1, κ
1,7	1-36	IgG1
1,11	47-82	IgG1
1,24	24-59	IgG1, κ
2,99	conf.	IgG1, κ
2,56	300-335	IgG2b, κ
2,67	277-312	IgG2b, κ
6,149	277-312	IgG1, κ
6,121	277-312	IgG1, κ
6,65	conf.	IgG1, λ
6,96	277-312	IgG1, κ

La capacidad de estos anticuerpos monoclonales para transferir la enfermedad, se ensayó mediante purificación Proteína-G de cantidades de mg de la IgG producida por estos hibridomas y la inyección intravenosa en receptores Balb/c inocentes. Como puede apreciarse en la Figura 9, la inyección conjunta de la inmunoglobulina anti-GPI de las células de hibridoma 6.121 y 2.99 provocó artritis en los receptores, pero ninguno de los anticuerpos pudieron inducir la enfermedad cuando se inyectaron solos. Entre estos anticuerpos, algunos actúan, tales como el 2.99 y el 6.121, mientras que otros no lo hacen. Sin embargo, la etapa e) del procedimiento para aislar los anticuerpos capaces de transferir la artritis según la invención, permite seleccionar los (anticuerpos) que actúan.

Referencias

Baronciani, L., Zanella, A., Bianchi, P., *et al.* (1996). Study of the molecular defects in glucose phosphate isomerase-deficient patients affected by chronic hemolytic anemia. *Blood*. 88, 2306-2310.

Claque, R.B. y Moore, L.J. (1984). IgG and IgM antibody to native type II collagen in rheumatoid arthritis serum and synovial fluid. Evidence for the presence of collagen-anticollagen immune complexes in synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 27, 1370-1377.

5 **De St Groth, S.F. y Scheidegger D., 1980.** Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 35:1

Faik, P., Walker, J.I., Redmill, A.A., y Morgan, M.J. (1988). Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3' sequences. *Nature* 332, 455-457.

10 **Feldmann, M., Brennan, F.M., y Ravider, N.M. (1996).** Rheumatoid Arthritis. *Cell* 85, 307-310.

Frei, Y., Lambris, J. y Stockinger, B. 1987. Generation of a monoclonal antibody to mouse C5. *Mol. Cell. Probes*, 1:141-9

15 **Gomm, S.A., Keevil, B.G., Thatcher, N., Hasleton, P.S., y Swindell, R.S. (1988).** The value of tumour markers in lung cancer. *Br. J. Cancer* 58, 797-804.

Gurney, M.E., Heinrich, S.P., Lee, M.R., y Yin, H.S. (1986). Molecular cloning and expression of neuroleukin, a neurotrophic factor for spinal and sensory neurons. *Science* 234, 566-574.

Hallbook, F., Persson, H., Barbany, G., y Ebendal, T. (1989). Development and regional expression of chicken neuroleukin (glucose-6-phosphate isomerase) messenger RNA. *J. Neurosci. Res.* 23, 142-151.

25 **Kanno, H., Fujii, H., Hirono, A., et al. (1996).** Molecular analysis of glucose phosphate isomerase deficiency associated with hereditary hemolytic anemia. *Blood.* 88, 2321-2325.

Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R., Martin T, Degott C, Kikutani H, Rajewsky K, Pasquali JL, Benoist C, Mathis D (1999). From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity. Apr;* 10(4):451-61.

Kouskoff, V., Korganow, A-S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C., y Mathis, D. (1996). Organ-specific disease provoked by systemic autoreactivity. *Cell* 87, 811-822.

35 **Lanzavecchia, A. (1985).** Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 314, 537-539.

Mannik, M. (1992). Rheumatoid factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol. Suppl.* 32, 46-49.

40 **Matsumoto I, Staub A, Benoist C, Mathis D. (1999).** Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science.* Nov 26;286(5445):1732-5.

Neri, B., Becucci, A., Ciapini, A., Comparini, T., Guidi, G., y Guidi, S. (1983). Chronobiological aspects of phosphohexoseisomerase in monitoring multiple myeloma. *Oncology.* 40, 332-335.

45 **Niinaka, Y., Paku, S., Haga, A., Watanabe, H., y Raz, A. (1998).** Expression and secretion of neuroleukin/ phosphohexose isomerase/maturation factor as autocrine motility factor by tumor cells. *Cancer Res.* 58, 2667-2674.

Panayi, G.S., Lanchbury, J.S., y Kingsley, G.H. (1992). The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 35, 729-735.

50 **Paulick, R., Caffier, H., y Paulick, M. (1987).** Comparison of serum CEA, PHI, and TPA as tumor markers in breast cancer patients. *Cancer Detect. Prev.* 10, 197-203.

55 **Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J-C., y Ferrara, P. (1992).** In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 203, 173-179.

Rudolphi, U., Rzepka, R., Batsford, S., et al. (1997). The B cell repertoire of patients with rheumatoid arthritis. II. Increased frequencies of IgG+ and IgA+ B cells specific for mycobacterial heat-shock protein 60 or human type II collagen in synovial fluid and tissue. *Arthritis Rheum.* 40, 1409-1419.

60 **Schwemmer, B., Schutz, W., Kuntz, R.M., y Lehmer, A. (1985).** Simultaneous determination of six tumor markers in patients with prostatic carcinoma and bladder tumors. *Urol. Res.* 13, 133-136.

65 **Sebbag, M., Simon, M., Vincent, C., et al. (1995).** The anti-perinuclear factor and the so-called anti-keratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 95, 2672-2679.

Thomas, R. y Lipsky, P.E. (1996). Presentation of self peptides by dendritic cells: possible implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39, 183-190.

Wang Y, Rollins SA, Madri JA, Matis LA. 1995. Anti-c5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:8955-9.

Warner, C.M., Briggs, C.J., Balinsky, D., y Meyer, T.E. (1985). Glucose phosphate isomerase activity in C57BL/6 and a mice of different ages. *Gerontology.* 31, 315-320.

Watson WC, Brown PS, Pitcock JA, Townes AS. 1987. Passive transfer studies with type II collagen antibody in B10.D2/old and new line and C57B1/6 normal and beige strains: evidence of important roles for C5 and multiple inflammatory cell types in the development of erosive arthritis Rheum. 30:460-5.

West, J.D., Flockhart, J.H., Peters, J., y Ball, S.T. (1990). Death of mouse embryos that lack a functional gene for glucose phosphate isomerase. *Genet Res.* 56, 223-236.

Xu, W., Seiter, K., Feldman, E., Ahmed, T., y Chiao, J.W. (1996). The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase. *Blood.* 87, 4502-4506.

Zvaifler, N.J. (1973). The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Adv. Immunol.* 265, 265-3.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el diagnóstico de la artritis, que comprende detectar en una muestra de plasma o suero de un paciente, la presencia de autoanticuerpos contra la proteína glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI).

2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende un ensayo ELISA de la muestra.

3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende un ensayo RIA de la muestra.

4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la utilización de un sustrato revestido con la proteína glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI).

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la proteína glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI) es una proteína recombinante.

6. Utilización de la proteína glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI) y sus anticuerpos para el diagnóstico de la artritis *in vitro*.

7. Procedimiento para producir un mamífero artrítico no humano, en el que la artritis es inducida por la inyección repetida de anticuerpos contra la proteína glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI).

8. Procedimiento para producir un ratón artrítico, en el que la artritis es inducida por la inyección repetida de anticuerpos contra la proteína glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI) o del suero del ratón transgénico artrítico K/BxN o de sus fracciones.

9. Procedimiento para determinar el potencial antiartrítico de una composición, **caracterizado** por la evaluación del efecto de la administración de dicha composición sobre el proceso artrítico del animal producido mediante el procedimiento según la reivindicación 7 u 8.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, que comprende i) detectar el curso temporal de la inflamación y la destrucción de las articulaciones en un ratón no artrítico, al que se le administró una dosis conocida de suero artrítico o de inmunoglobulinas y que recibió asimismo la composición anti-artrítica, para ser ensayado antes, junto con o después del suero artrítico o de la inmunoglobulina; e ii) comparar el curso temporal de la inflamación y la destrucción de las articulaciones en dicho primer ratón con el curso temporal de la inflamación y la destrucción de las articulaciones en un segundo ratón del mismo genotipo que recibió el mismo suero artrítico o las mismas inmunoglobulinas, pero que no se expuso a dicha composición anti-artrítica.

11. Procedimiento según la reivindicación 9, que comprende i) detectar el grado de inflamación, la destrucción de las articulaciones y la deformación de los miembros en un primer ratón no artrítico, al que se le administró una dosis conocida de suero artrítico o de inmunoglobulinas que recibió asimismo la composición anti-artrítica, para ser ensayado antes, junto con o después del suero artrítico o de la inmunoglobulina; e ii) comparar el grado de inflamación, la destrucción de las articulaciones y la deformación de los miembros en un segundo ratón del mismo genotipo que recibió el mismo suero artrítico o las mismas inmunoglobulinas, pero que no se expuso a dicha composición anti-artrítica.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que las inmunoglobulinas artríticas son anticuerpos monoclonales o sus combinaciones.

13. Utilización de un kit que comprende por lo menos una proteína glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI) o un fragmento de la misma, que comprende un epítipo inmunoestimulador para el diagnóstico *in vitro* de la artritis.

14. Procedimiento para aislar anticuerpos monoclonales capaces de transferir la artritis, que comprende las etapas que consisten en:

- a) preparar hibridomas a partir de linfocitos de esplenocitos de mamíferos artríticos,
- b) seleccionar dichos hibridomas en condiciones de dilución limitada en un medio HAT,
- c) rastrear hibridomas que produzcan anticuerpos dirigidos contra la proteína glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI) en un ensayo ELISA,
- d) expansión y clonación de los hibridomas seleccionados en la etapa c),
- e) ensayo de dichos anticuerpos producidos por los hibridomas seleccionados en la etapa d), en combinación o solos, respecto a su capacidad para transferir la artritis, en el que la etapa e) se consigue detectando el inicio de la destrucción de las articulaciones y la deformación de los miembros por la inflamación en el ratón normal al que se administró una dosis conocida de dichos anticuerpos.

ES 2 269 127 T3

15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que los hibridomas se preparan a partir de los esplenocitos de ratones K/BxN.

5 16. Composición capaz de transferir la artritis en un animal, **caracterizada** porque comprende una combinación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI).

17. Utilización de una composición según la reivindicación 16, para transferir la artritis en animales de ensayo no humanos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



FIGURA 1A

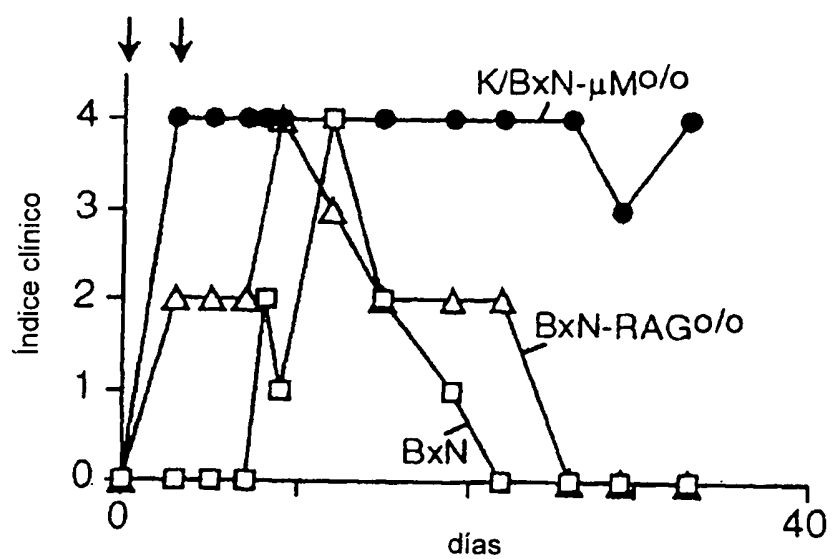


FIGURA 1B

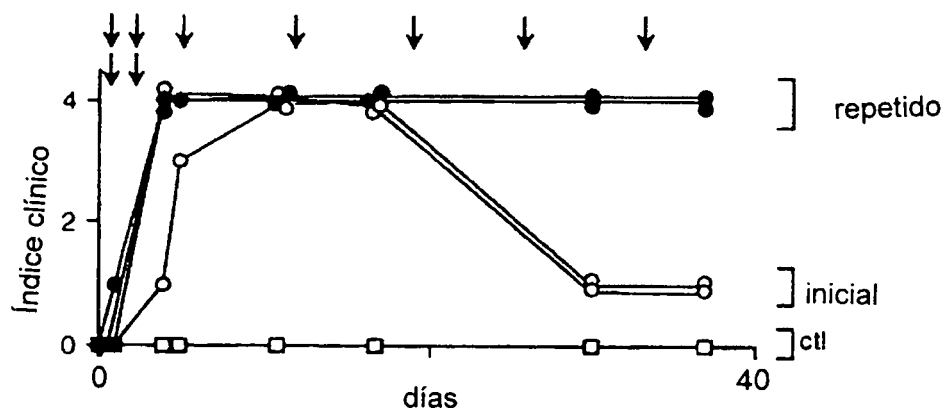
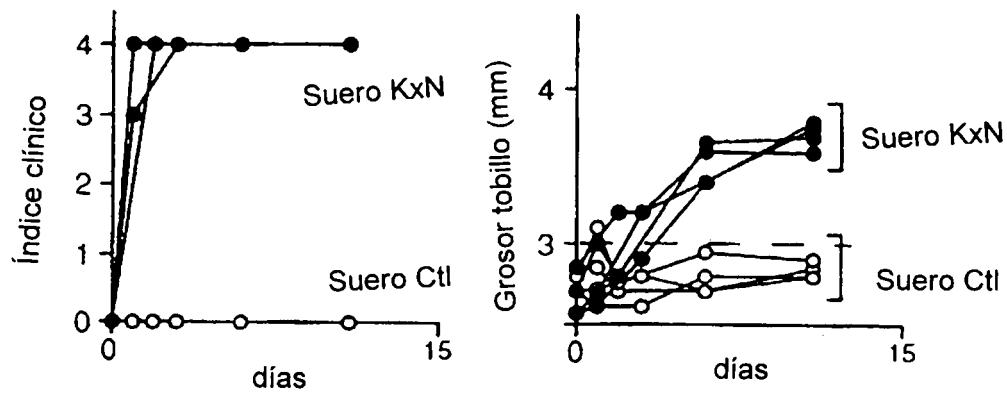


FIGURA 1C

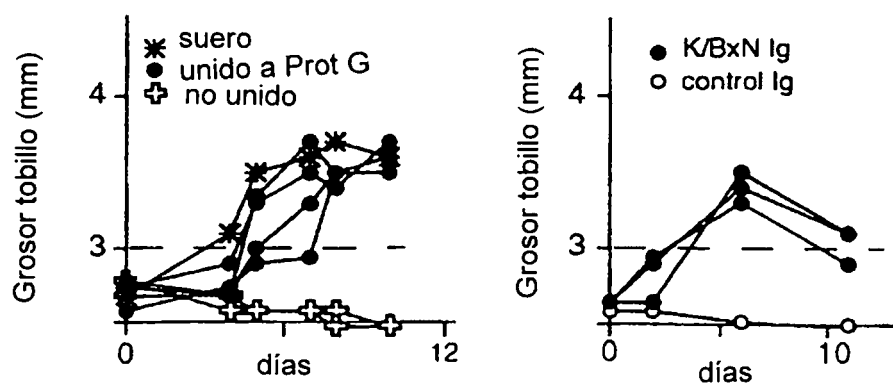


FIGURA 1D

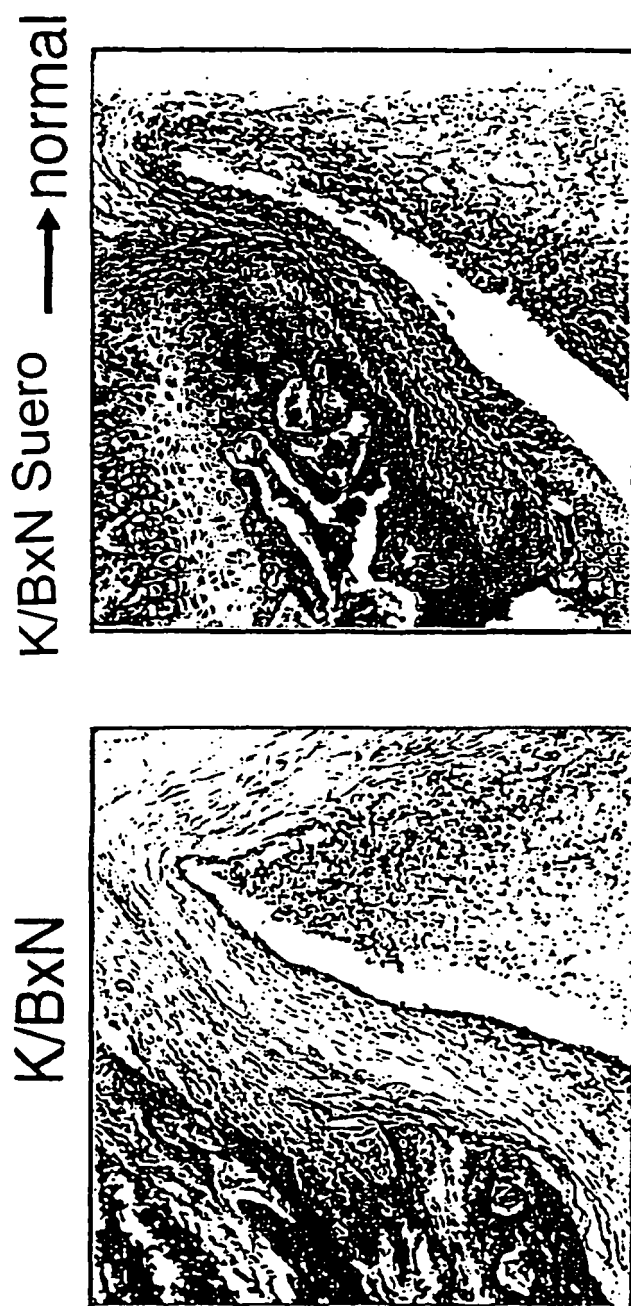


FIGURA 2

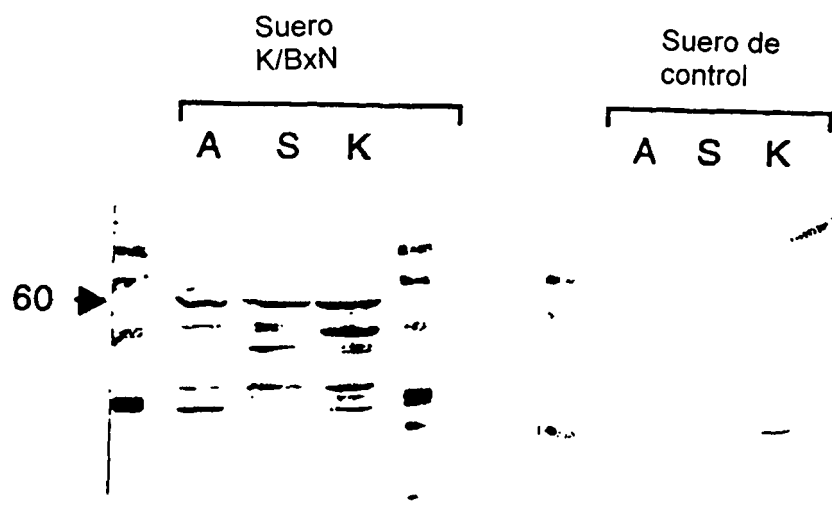


FIGURA 3

1 MAALTRNPQFQKLEWHRANSANLKLRELFEADPERFNNFSLNLTNHNHGHILVDYSKNLV
 61 NKEVMQMLVELAKSRGVEAARDNMFSGSKINYTEDRAVLHVALRNRSTP IKVDGKDVMF
 121 EVNRVLDKMKSFQQRVRSRGDWKGYTGKSIDI INIGIGGSDLGPLMVTEALKP YSKGGPR
 181 VWFVSNIDGTHIAKTLASLSPETSLEIIASKTFTTQETITNAETAKEWFEAAKDP SAVA
 241 KHFVALSTNTAKVKEFGIDPQNMFEFWDWVGGRYSLWSAIGLSIALHVGFDFHEQLLSGA
 301 HWMQDHFLEKTPLEKNAPVLLALLGIWY INCYGCETHALLPYDQYMHRAAYFOQGDMESN
 361 GKYITKSGARVDHQTGPI VWGEPGTNGQHAFYQLIHQGTKMIPCDELIPVQTQHP IIRKGL
 421 HHKILLANFLAQTEALMKGLPEEARKELOAAGKSPEDLEKLLPHKVFEGNRP TNSIVFT
 481 KLTPFILGALIAMYEHKIFVQGIMWDINSEFQWGVGLGKQLAKKIEPELEGSSAVTSHDS
 541 STNGLISFIKQQRDTKLE

FIGURA 4

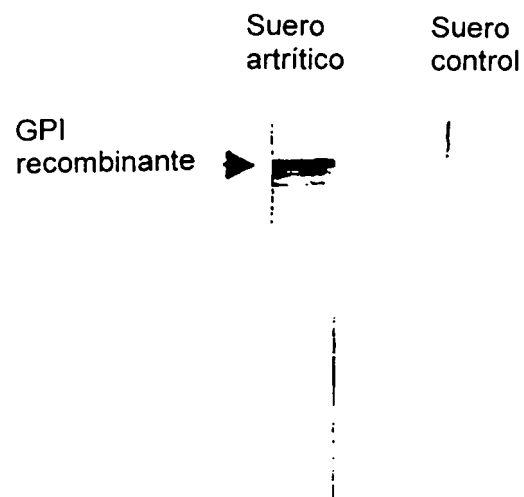


FIGURA 5

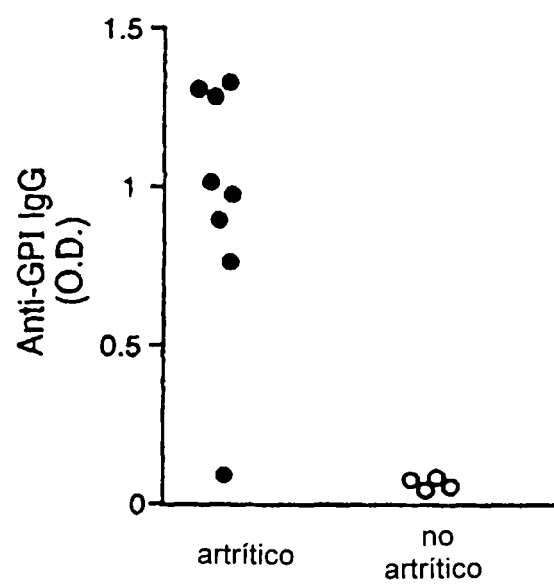


FIGURA 6

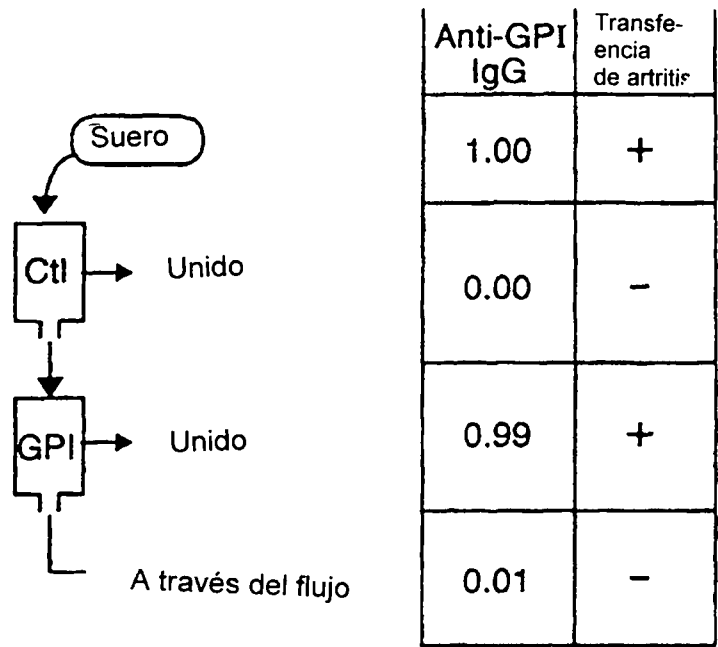


FIGURA 7A

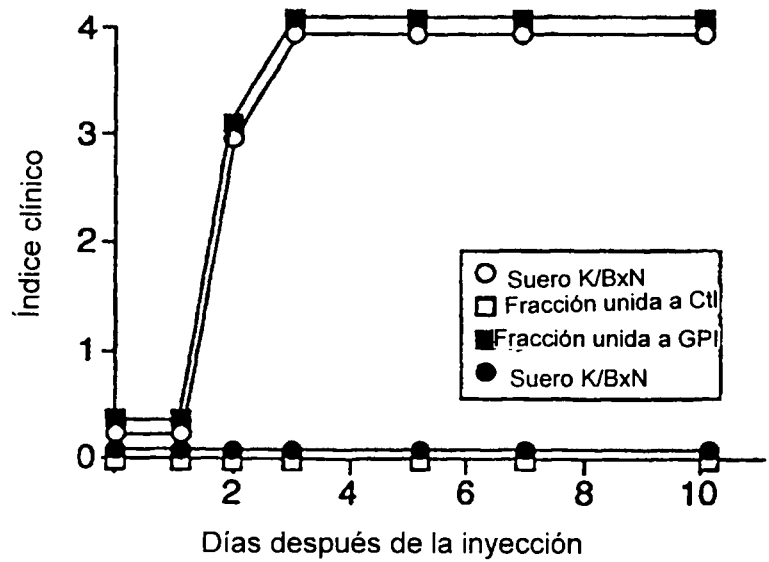


FIGURA 7B

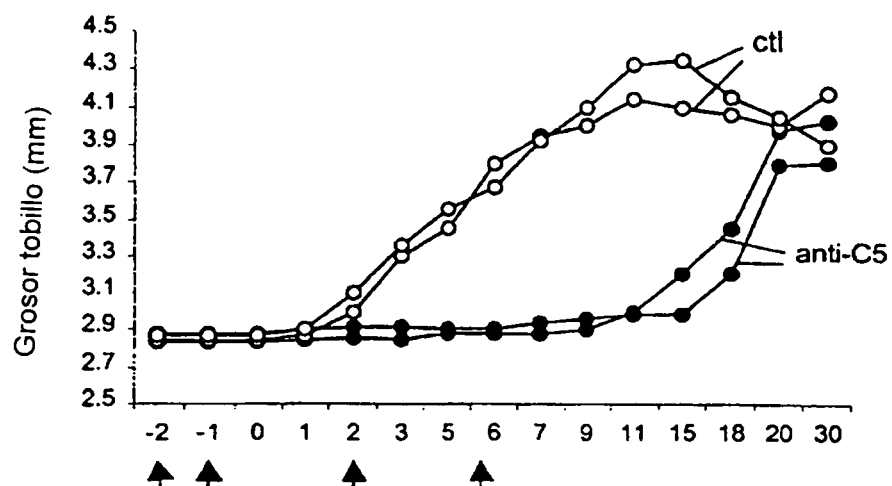


FIGURA 8

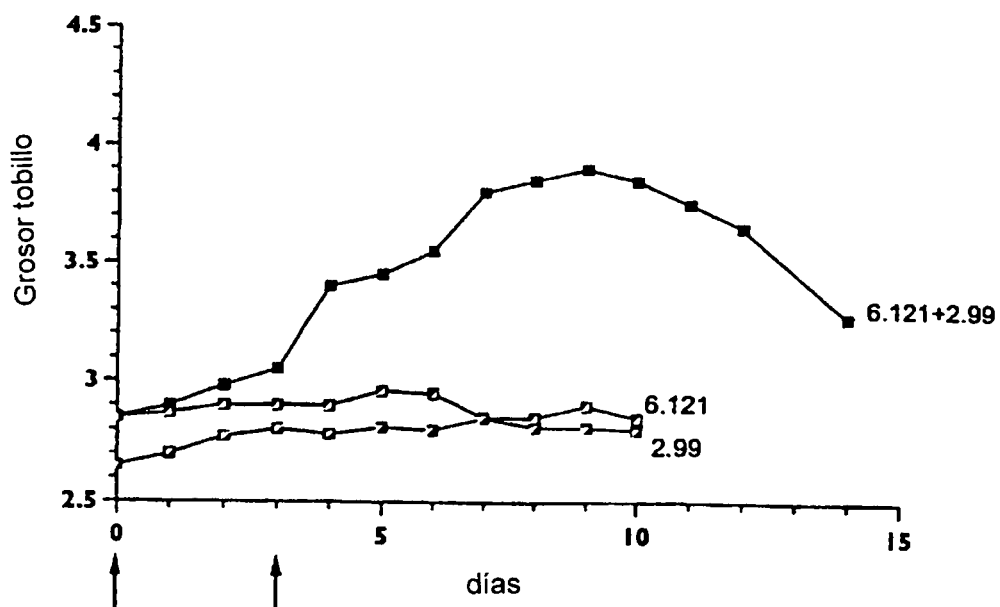


FIGURA 9