

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 721**

51 Int. Cl.:
G01N 33/564 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03772203 .0**
96 Fecha de presentación: **13.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1552308**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.07.2005**

54 Título: **ADN DE MEMBRANA DESMETILADO Y/U OXIDADO Y USO DEL MISMO EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES.**

30 Prioridad:
15.10.2002 US 270160
15.01.2003 EP 03000837

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.03.2012

73 Titular/es:
BIOTECH TOOLS S.A.
RUE DE RANSBEEK 230, BLOC V
1120 BRUXELLES, BE

72 Inventor/es:
LEGON, Thierry;
HENOT, Frédéric y
QUESTIAUX, Nadine

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 375 721 T3

DESCRIPCIÓN

ADN de membrana desmetilado y/o oxidado y uso del mismo en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de ADN asociado a la membrana citoplásmica oxidado y/o desmetilado (cADNm) o ADN de membrana (ADNm) y ADNm oxidado y/o desmetilado.

También se refiere a una célula que comprende el ADN de membrana oxidado y/o desmetilado y al uso diagnóstico y farmacéutico del ADN de membrana oxidado y/o desmetilado y a las células que comprenden tal ADNm.

Antecedentes de la invención

10 El documento US 6.057.097, incorporado por referencia, divulgó marcadores para patologías que comprenden una reacción autoinmune y marcadores para enfermedades inflamatorias.

Como se desvela en el presente documento, numerosas patologías que comprenden una reacción autoinmune y enfermedades inflamatorias tienen una etiología dudosa o desconocida y pueden tener un origen multifactorial.

15 El diagnóstico de algunas de estas enfermedades es difícil o dudoso. Una enfermedad especialmente mencionada en el presente documento es el lupus eritematoso sistémico (SLE). Antes del documento US 6.057.097 no había sido posible proporcionar una estructura antigénica específica suficiente para obtener un diagnóstico confiable tanto en especificidad como sensibilidad para las mencionadas patologías, en especial el SLE.

El documento US 6.057.097 resuelve el problema suministrando una estructura antigénica denominada ADN asociado a membrana citoplásmica (cADNm) o ADN de membrana (ADNm).

20 Este antígeno es reconocido por los anticuerpos presentes en los fluidos biológicos de sujetos que sufren de las enfermedades mencionadas. Esta estructura antigénica se prepara a partir de células, especialmente de linfocitos 1B tales como las células Wil-2.

El objetivo de la presente es proporcionar una estructura antigénica mejorada y de este modo una mejor herramienta diagnóstica que demuestre una mayor especificidad y sensibilidad.

25 Un objetivo adicional es proporcionar un procedimiento de selección para sustancias farmacéuticas útiles en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes y/o inflamaciones.

Un objetivo adicional es proporcionar una composición farmacéutica.

Sumario de la invención

De acuerdo con la invención, la estructura antigénica se prepara por un procedimiento para la preparación de ADN de membrana en una condición oxidada y/o desmetilada.

30 Este procedimiento comprende las etapas de

- tratar una célula con un factor de estrés seleccionado del grupo que consiste en irradiación UV, reactivos oxidantes, sales de metales pesados, fármacos, análogos nucleosídicos y nucleotídicos, inhibidores enzimáticos, activadores enzimáticos y cambio de pH
- lisis de la célula para dar un lisado celular
- 35 • purificación del ADN de membrana oxidado y/o desmetilado a partir del lisado celular.

Se considera que el tratamiento con factores de estrés aumenta la cantidad de ADN de membrana oxidado y/o aumenta la desmetilación del ADN de membrana en la célula. Posteriormente, el ADN se aísla de una manera similar a la previamente conocida a partir del documento US 6.057.097.

"ADN de membrana oxidado y/o desmetilado" es ADNm que está oxidado o desmetilado, o ambos.

40 "ADN de membrana oxidado" es ADN de membrana que comprende más nucleótidos oxidados en relación con el ADNm de células no tratadas con los factores de estrés. Dichos nucleótidos oxidados pueden ser, por ejemplo, 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina y/o timidina glicol y/o 7,8-dihidroxi-8-oxoadenosina y/u 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina.

45 El nucleótido oxidado más abundante es la 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG). El ADNm oxidado puede comprender preferentemente más de 0,5%, más preferentemente más de 1%, con máxima preferencia más de 3% de toda la guanosina en forma oxidada.

"ADNm desmetilado" es un ADNm que comprende menos nucleótidos metilados que el ADN preparado a partir de las células sin tratamiento con un factor de estrés.

El nucleótido metilado es usualmente citosina. Tal metilación se produce sobre todo en el contexto de dinucleótidos CpG en vertebrados y a menudo está asociada con la represión de la transcripción.

- 5 Preferiblemente, la cantidad de citosina 5-metilada es menor del 90% del ADNm no tratado, más preferentemente 50% o menor y con máxima preferencia 30% o menor.

También se cree que el tratamiento con factores de estrés, tales como, sin limitación, estrés oxidativo, puede generar transversiones o mutaciones, tales como, sin limitación, G a T, en la secuencia del ADN de membrana en la célula. En consecuencia, "ADN de membrana oxidado y/o desmetilado" puede ser ADN de membrana que
10 comprende al menos las mismas cantidades de nucleótidos oxidados y/o metilados en relación con el ADNm de las células no tratadas con factores de estrés, pero con una secuencia de nucleótidos diferente.

Los factores de estrés adecuados son, por ejemplo, dicromato, peróxido de hidrógeno, permanganato, quinidina, D-pencilamina, hidralazina, procainamida, metabolitos de ARN/ADN, análogos nucleosídicos y nucleotídicos tales como 5-aza-citidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, inhibidores de metilasas del ADN, inhibidores de histona desacetilasas
15 tales como butiratos o tricostatina A, inhibidores de histona acetiltransferasas, inhibidores de histona arginina e histona lisina metiltransferasas, inhibidores de proteína quinasas tales como estaurosporina o callostina C o K-252a o H-89, activadores de proteína quinasas tales como ésteres de forbol o briostatina 1, inhibidores de proteína fosfatasa tales como caliculina A o ácido okadaico, inhibidores de la poli(ADP-ribosa) polimerasa tales como 3-aminobenzamida o m-yodobencilguanidina hemisulfato, inhibidores de enzimas conjugadoras de ubiquitinas tales
20 como ubiquitina metilada, inhibidores de ubiquitina C-terminal hidrolasa tales como ubiquitina aldehído, inhibidores de enzimas involucradas en la corrección de errores de replicación y/o daño espontáneo del ADN tales como los iones cadmio, inhibidores de la N- glicosilación tales como tunicamicina, inhibidores de los proteasomas 20S o 26S tales como la lactacistina, inhibidores de la farnesilación tales como el ácido alfa-hidroxi-farnesilfosfónico, inhibidores de la geranilgeranilación, inhibidores de la metilación de proteínas tales como la ebelactona B, inhibidores de la catalasa, inhibidores de la superóxido dismutasa, inhibidores de la glutatión peroxidasa, inductores de la hipermetilación del ADN, inductores de la metilación de los fosfolípidos, inhibidores de la metilación de los fosfolípidos tales como la 3-deazaadenosina o la 3-deaza-(±)-aristeromicina, o combinaciones de los mismos.

Un factor de estrés adecuados adicional es un cambio de pH. Un cambio de pH es un cambio del pH del ambiente de al menos 0,2 unidades de pH, preferentemente 0,4 unidades de pH.

- 30 Un factor de estrés adecuado adicional es, por ejemplo, la irradiación UV. La irradiación UV preferentemente se combina con reactivos oxidantes.

Los reactivos oxidantes adecuados son, por ejemplo, H₂O₂ o el oxígeno molecular.

A partir del oxígeno molecular, se pueden obtener especies activas tales como el radical superóxido (O₂[•]) y el radical hidroxilo -(HO•); véase, por ejemplo, "Proceedings of the society for experimental biology and medicine"
35 1999, páginas 246 a 252. Los metales pesados adecuados son sales de cadmio, sales de cromo o mezclas de las mismas. Se pueden usar solas o en combinación con los reactivos oxidantes, por ejemplo O₂ o H₂O₂.

Una realización adicional de la presente invención es el ADN de membrana (ADNm) oxidado y/o desmetilado que se puede obtener de acuerdo con el procedimiento de la invención.

Tal ADN de membrana oxidado y/o desmetilado o fragmentos del mismo son útiles como una estructura antigénica en una prueba diagnóstica de enfermedades autoinmunes. Los fragmentos del ADNm o fragmentos de ADN de membrana oxidado y/o desmetilado se pueden obtener por procedimientos conocidos en la técnica tales como, sin limitación, sonicación, digestión enzimática con nucleasas y/o enzimas de restricción.
40

En otra realización el ADN de membrana oxidado y/o desmetilado o fragmentos del mismo también se asocian con proteínas de unión al ADN, con máxima preferencia histonas.

- 45 Estas proteínas de unión al ADN pueden ser hipo- o hiperacetiladas, hipo- o hiperfosforiladas, hipo- o hipermetiladas, hipo- o hiperubiquitinadas, hipo- o hiper-(poli-ADP-ribosiladas) o hipo- o hiperglicosiladas o sus combinaciones.

Otra realización de la presente invención son células que comprenden ADN de membrana de la presente invención.

En una forma de realización preferida de la invención, las células se seleccionan del grupo de los leucocitos, en especial neutrófilos y/o linfocitos B y/o células linfoblastoides y/o monocitos, o las células se seleccionan de los grupos de microorganismos, tales como, sin limitación, Tetrahymena thermophila y Tetrahymena pyriformis.
50

Tales células se pueden obtener por un procedimiento que comprende la etapa de tratar una célula con un factor de estrés seleccionado del grupo que consiste en irradiación UV, reactivos oxidantes, sales de metales pesados, fármacos, análogos nucleosídicos y nucleotídicos, inhibidores enzimáticos, activadores enzimáticos y cambio de pH.

Los factores de estrés adecuados se desvelan más arriba.

Otra realización de la invención es un agente diagnóstico que comprende ADN de membrana oxidado y/o desmetilado, fragmentos de este ADNm o células que comprenden el ADN de membrana oxidado y/o desmetilado.

Este agente diagnóstico se puede usar en diferentes pruebas diagnósticas.

5 En una realización, la presente invención en consecuencia cubre un procedimiento para la detección de una enfermedad autoinmune que comprende las etapas de

- poner un fluido biológico de un animal que contiene anticuerpos en contacto con el agente diagnóstico de la invención.
- medir la unión de dichos anticuerpos con dicho agente diagnóstico,

10 en el que la unión indica una enfermedad autoinmune del animal.

En una realización preferida, el agente diagnóstico está en forma de células y las células están o pueden estar unidas a un soporte sólido antes de poner el fluido biológico en contacto con el agente diagnóstico. Tal unión puede ser covalente o no covalente, ya sea a través de la interacción ligando/receptor o ligando/proteína o células/(estrept) avidina biotinilada, lectina/anti-lectina o a través de una unión covalente entre un soporte activado sólido y grupos amino, ácido o sulfhidrilo o carbohidratos o carbohidratos oxidados de la superficie celular.

15

En una segunda realización, la presente invención cubre un procedimiento para la detección in vitro de una enfermedad autoinmune que comprende las etapas de

- poner una muestra biológica de un animal que contiene células en contacto con anticuerpos dirigidos contra el ADNm oxidado y/o desmetilado o fragmento del mismo de la reivindicación 4

20 • medir la unión de dichos anticuerpos con dichas células,

en el que la unión indica una enfermedad autoinmune del animal.

Preferentemente estas pruebas diagnósticas se realizan in vitro.

Tales pruebas diagnósticas también son útiles con otros antígenos, que se modifican en forma (bio)química por tratamiento de una célula con un factor de estrés.

25 En una prueba adecuada, las células se podrían usar para identificar la unión de los anticuerpos de los fluidos biológicos, en especial sangre o suero, a las células.

En forma alternativa, el ADN de membrana oxidado y/o desmetilado o los fragmentos del mismo se pueden usar en un sistema de prueba, por ejemplo en un ELISA, o en un ensayo de desplazamiento en gel para identificar la unión.

30 Una realización adicional de la invención es usar el agente diagnóstico para detectar la unión de los anticuerpos al ADN de membrana. Tal unión indica una enfermedad autoinmune del animal.

En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar fármacos por un procedimiento de detección. Este procedimiento de detección comprende medir la unión de los anticuerpos al ADN de membrana oxidado y/o desmetilado o fragmentos del mismo o a células que comprenden ADN de membrana oxidado y/o desmetilado. La influencia de las potenciales sustancias sobre la unión de los anticuerpos indica si tales sustancias son o no composiciones farmacéuticas útiles.

35

Aún otra realización de la presente invención es una formulación farmacéutica que comprende el ADN de membrana oxidado y/o desmetilado o fragmentos del mismo o células que comprenden ADN oxidado y/o desmetilado. Tal composición farmacéutica se puede usar para disminuir los anticuerpos autoinmunes de un paciente de las estructuras del paciente, reduciendo o curando de este modo la enfermedad.

40 Esta formulación farmacéutica también se podría utilizar en forma de vacuna.

En consecuencia, el uso de la formulación farmacéutica para tratar las enfermedades autoinmunes en un animal también es parte de la invención.

La presente invención se explica adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

45 Cultivo celular

La línea celular del linfoblastoide humano B (WiI2 NS) obtenida de ICN Flow Laboratories (ECACC No 90112121) se

mantiene en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (inactivado por calor y analizado para determinar la ausencia de micoplasma), L-glutamina y 1% de penicilina-estreptomicina, en una estufa húmeda a 37°C y 5% de CO₂.

Sueros

- 5 Los sueros se obtienen a partir de pacientes afectados por diversas enfermedades inflamatorias o patologías que tienen una reacción autoinmune y a partir de individuos normales. Los sueros se obtienen de sangre coagulada centrifugada y mantenida a -20°C hasta el uso.

En todos los experimentos que se describen a continuación, los sueros de los pacientes con SLE que son positivos en la prueba de acuerdo con US 6.057.97 son siempre positivos cualquiera sea el tratamiento celular.

- 10 LED 0 significa pacientes con SLE, que cumplen con al menos cuatro de los criterios de SLEDAI, de los cuales los sueros diluidos 1/30 no dan un patrón positivo en la prueba del documento US 6.057.097.

El RF se usa para "sueros de pacientes afectados por diversas enfermedades o patologías inflamatorias pero no SLE".

Oxidación in vitro del ADNm

- 15 Las células Wil2 NS se lavan tres veces con solución de Hank (Gibco BRL) y se resuspenden a razón de $0,25 \times 10^6$ células/mL y posteriormente se siembran en portaobjetos de vidrio divididos en 20 µL/pocillo. Después de secar a 37°C durante 2 horas, en una estufa, las células se fijan durante 3 minutos en metanol. Las células posteriormente se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente en presencia de suero con albúmina anti-humana de cabra (Dia-Sorin) diluido en proporción 1/35 en 30 µL de PBS. Los portaobjetos posteriormente se lavan en PBS.
- 20 Los portaobjetos se expusieron a peróxido de hidrógeno 1% en PBS y se irradiaron inmediatamente con UVB a 254 nm durante 1 hora bajo una lámpara UV-CAMAG. La irradiación se realizó a temperatura ambiente en la oscuridad a 13 cm de los portaobjetos.

- 25 Los portaobjetos se incuban durante 30 minutos en presencia de sueros de diferentes pacientes diluidos 1/10 en PBS/Tween 0,05% (calidad cultivo celular) a razón de 20 µL/pocillo y se lavan nuevamente con PBS. Los portaobjetos se incuban adicionalmente durante 30 minutos en la oscuridad en presencia de 30 µL de IgG anti-humana de cabra conjugada con fluoresceína (Inova) dializada toda la noche a 4°C en Slide-A-Lyser 10.000 MWCO (Pierce) y posteriormente se centrifugan tres veces en un Centricon MY-10 (Millipore). Se realiza un lavado final de los portaobjetos con PBS solo, seguido por PBS que contiene Azul de Evans como coloración de contraste. Finalmente, los portaobjetos se montan en glicerina/PBS (1:1) de pH 8,4, y se visualizan por medio de inmersión UV (Nikon).
- 30

Resultados:

Se realizó la oxidación in vitro con H₂O₂+UV_{254nm}, y se analizaron 45 sueros (5 sujetos sanos, 10 autoinmunes, y 30 con artritis reumatoide).

Sueros, dilución 1/10	Sin oxidación según US 6.057.097		oxidación	
	positivo	negativo	positivo	negativo
LED 0	8	2	7	3
RF	32	13	3	42

- 35 Obviamente, la oxidación in vitro del ADNm aumenta la especificidad y sensibilidad del ensayo y permite identificar más pacientes con SLE.

Oxidación in vivo del ADNm

- 40 Una combinación de acetato de cadmio (Cd), dicromato de sodio (Cr) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se añadió (a las concentraciones finales de 10 µM, 10 µM y 20 µM, respectivamente) al cultivo 17 horas 30 minutos antes de extraer las células en la fase de crecimiento logarítmico. La preparación, a una densidad de 1,0 a $1,5 \times 10^6$ células/mL, se evaluó para determinar la viabilidad antes y al final del experimento por exclusión con azul tripano. La viabilidad debe ser mayor del 95%.

- 45 Las células Wil2 NS se lavan una vez en PBS (solución salina tamponada con fosfato, 10 mM, pH 7,4), posteriormente una vez en PBS suplementado con ATP a una concentración final de 500 µM. Después de esto, se

incubaban durante 30 minutos a temperatura ambiente en presencia de albúmina anti-humana de cabra (Dia-Sorin) diluida 1/35 en PBS. Las células posteriormente se recolectan por centrifugación, y se resuspenden a razón de $0,26 \times 10^6$ células/mL y posteriormente se siembran en portaobjetos de vidrio divididos en 20 μ L/pocillo.

Después de secar a 37°C durante 2 horas en una estufa, las células se fijan durante 3 minutos en metanol y se lavan una vez en PBS (solución salina tamponada con fosfato, 10 mM, pH 7,4).

Se incuban durante 30 minutos en presencia de sueros de diferentes pacientes diluidos 1/20 en PBS/ Tween 0,05% (calidad cultivo celular) a razón de 20 μ L/pocillo y se lavan nuevamente con PBS. Los portaobjetos se incuban adicionalmente durante 30 minutos en la oscuridad en presencia de 30 μ L de IgG F(ab2)' anti-humana de cabra conjugada con fluoresceína (Sigma, dilución 1/60) e IgM anti-humana de cabra conjugada con fluoresceína (Sigma, dilución 1/70). Se realiza un lavado final de los portaobjetos con PBS solo, seguido por PBS que contiene azul de Evans como coloración de contraste. Finalmente, los portaobjetos se montan en glicerina/PBS (1:1), pH 8,4, y se visualizan por medio del microscopio de inmersión UV (Nikon), aumento (40X).

Resultados:

Cuando el crecimiento de las células se produce en RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS y los diversos productos, sólo 10 de 327 sueros de pacientes afectados por diversas enfermedades o patologías inflamatorias pero no SLE, dan un patrón positivo, y 15 de 31 sueros denominados "LED 0" dan un patrón positivo. La prueba tiene una especificidad del 97% y una sensibilidad del 82%.

Cuando el crecimiento de las células se produce en medio libre de suero (AIMV, Life Technologies) y los diversos productos, sólo 6 de 347 sueros de pacientes afectados por diversas enfermedades o patologías inflamatorias pero no SLE, dan un patrón positivo, y 18 de 31 sueros denominados "LED 0" dan un patrón positivo. La prueba tiene una especificidad del 98,3% y una sensibilidad del 84%.

Inhibición in vivo de ADN metilasas

Se añadió 5-aza-citidina a la concentración final de 1,0 μ M al cultivo 17 horas 30 minutos antes de la extracción de las células en la fase de crecimiento logarítmico. La preparación, a una densidad de $1,5$ a $1,8$ a $2,0 \times 10^6$ células/ml, se evaluó para determinar la viabilidad antes y al final del experimento por exclusión con azul tripan. La viabilidad debe ser mayor del 95%.

Los portaobjetos se incuban durante 30 minutos en presencia de sueros de diferentes pacientes diluidos 1/20 en PBS/Tween 0,05% (calidad cultivo celular) a razón de 20 μ L/pocillo y se lavan nuevamente con PBS.

Los portaobjetos se incuban adicionalmente durante 30 minutos en la oscuridad en presencia de 30 μ L de una mezcla de IgG anti-humana F(ab2)' de cabra conjugada con fluoresceína (Sigma, dilución 1/60) e IgM anti-humana de cabra conjugada con fluoresceína (Sigma, dilución 1/70).

Resultados:

suero	cantidad	dilución	Ox	AzaC
LED 0	3	1/10	3	3
RF	7	1/10	7	2
ox: Cr+Cd+H ₂ O ₂ ; AzaC: 5-aza-citidina				

El ADN_m desmetilado también es un buen antígeno y es bien reconocido por los anticuerpos anti-ADN_m de los sueros de los pacientes con SLE. La especificidad aumenta al mismo tiempo que la sensibilidad ya que el suero se puede diluir 1/10 en vez de 1/30.

Cabe señalar aquí que 6 de los 7 sueros RF son los que fueron "positivos" en el experimento descrito anteriormente.

Inhibición in vivo de la desacetilación de histonas

Se añadió butirato de sodio a la concentración final de 1,0 mM al medio de cultivo (medio libre de suero AIMV, Life Technologies) 17 horas 30 minutos antes de la extracción de las células en la fase de crecimiento logarítmico. La preparación, a una densidad de $1,5$ a $1,8 \times 10^6$ células/ml, se evaluó para determinar la viabilidad antes y al final del experimento por exclusión con azul tripan.

La viabilidad debe ser mayor del 95%.

Los portaobjetos se incuban durante 30 minutos en presencia de sueros de diferentes pacientes diluidos 1/20 en PBS/Tween 0,05% (calidad cultivo celular) a razón de 20 μ L/pocillo y se lavan nuevamente con PBS.

Los portaobjetos se incuban adicionalmente durante 30 minutos en la oscuridad en presencia de 30 μ L de una mezcla de IgG anti-humana F(ab2)' de cabra conjugada con fluoresceína (Sigma, dilución 1/60) e IgM anti-humana de cabra (Sigma, dilución 1/70).

Resultados:

suero	cantidad	dilución	NaBut
LED 0	7	1/20	7
RF	15	1/20	1
NaBut: butirato de sodio			

5

Parece que el control de la hiperacetilación de las histonas mejora la selectividad de la prueba. En consecuencia, el ADN de membrana se podría asociar con las histonas hiperacetiladas de la superficie celular (estructuras similares a nucleosomas).

Uso de fármacos

- 10 Se añadieron hidralazina o procainamida a la concentración final de 10^{-5} M al medio de cultivo (medio libre de suero AIMV, Life Technologies) 17 horas 30 minutos antes de la extracción de las células en la fase de crecimiento logarítmico. La preparación, a una densidad de $1,5$ a $1,8 \times 10^6$ células/ml, se evaluó para determinar la viabilidad antes y al final del experimento por exclusión con azul tripan.

La viabilidad debe ser mayor del 95%.

- 15 Los portaobjetos se incuban durante 30 minutos en presencia de sueros de diferentes pacientes diluidos 1/20 en PBS/Tween 0,05% (calidad cultivo celular) a razón de 20 μ L/pocillo y se lavan nuevamente con PBS.

Los portaobjetos se incuban adicionalmente durante 30 minutos en la oscuridad en presencia de 30 μ L de una mezcla de IgG anti-humana F(ab2)' de cabra conjugada con fluoresceína (Sigma, dilución 1/60) e IgM anti-humana de cabra (Sigma, dilución 1/70).

- 20 Resultados:

suero	cantidad	dilución	Hidralazina	Procainamida
LED 0	6	1/20	2	2
RF	9	1/20	2	1

- 25 Después de tratar las células con uno de los fármacos, bien conocidos por inducir el lupus, el ADNm también es un buen antígeno y es bien reconocido por los anticuerpos anti-ADNm de los sueros de pacientes con SLE. La especificidad aumenta al mismo tiempo que la sensibilidad ya que el suero se puede diluir 1/20 en vez de 1/30 o 1/40.

Presencia de 8-oxo-2'-desoxiguanosina

- 30 Los portaobjetos tratados con H₂O₂-irradiación UV o los portaobjetos producidos con las células cultivadas en presencia de Cd+Cr+H₂O₂ o 5-azacitidina o butirato de sodio se incuban durante la noche a 4°C en presencia de 30 μ L de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-8-oxo-dG (Gentaur) diluido 1/100 en Tris.HCl 10 mM, pH 7,5, con 10% de suero fetal bovino. Los portaobjetos se lavan una vez en PBS y posteriormente se incuban durante 40 minutos en presencia de un anticuerpo IgG1 anti-ratón de cabra (Southern Biotechnology Associates, Inc) diluido a una concentración de 0,1 μ g/1 $\times 10^6$ células en PBS.

Se realiza un lavado final de los portaobjetos en PBS y los portaobjetos se montan en glicerina/PBS pH 8,4 antes de la visualización por medio de microscopio de inmersión UV.

- 35 Resultados:

Un patrón positivo 5 representado por un patrón puntiforme verde sobre la membrana celular demuestra que la 8-Oxo-dG está presente en la superficie celular cuando se llevó a cabo la oxidación del ADNm sea in vivo (Cd+Cr+H₂O₂) o in-vitro (H₂O₂+UV) de acuerdo con el procedimiento descrito más arriba.

También se evidencia un patrón positivo cuando las células se cultivan en presencia de 5-aza-citidina pero no en

presencia de butirato de sodio.

Presencia de 5-metilcitosina

5 Los portaobjetos producidos con las células cultivadas en presencia de Cd+Cr+H₂O₂ o 5-azacitidina o butirato de sodio se incuban durante la noche a 4°C en presencia de 30 µl de un anticuerpo anti-5-metilcitosina de oveja (Abcam, Ab1884) diluido 1/100 en PBS. Los portaobjetos se lavan una vez en PBS y posteriormente se incuban durante 15 segundos en presencia de 30 µl de NaOH 7 x 10⁻⁵ N. Después del lavado con PBS, los portaobjetos se incuban finalmente 30 minutos en presencia de un anticuerpo IgG anti-oveja de asno (Southern Biotechnology Associates, Inc) diluido a una concentración de 0,1 µg/1 x 10⁶ células en PBS.

10 Se realiza un lavado final de los portaobjetos en PBS y los portaobjetos se montan en glicerina/PBS pH 8,4 antes de la visualización por medio de microscopio de inmersión UV.

Resultados:

Un patrón positivo para identificar la 5-metilcitosina dentro de las células está representado por una fluorescencia verde intracelular.

15 Se produjo la fuerte metilación global del ADN en las células cultivadas en presencia de Cd+Cr+ H₂O₂ o butirato de sodio pero no en presencia de 5-azacitidina, si bien la fluorescencia verde intracelular de las células tratadas con butirato de sodio no es tan fuerte como en el primer caso.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de ADN de membrana (ADNm) oxidado y/o desmetilado que comprende las etapas de
 - 5 • tratar una célula con un factor de estrés seleccionado del grupo que consiste en irradiación UV, reactivos oxidantes, sales de metales pesados, fármacos, análogos nucleosídicos y nucleotídicos, inhibidores de enzima y cambio de pH
 - lisis de la célula para dar un lisado celular
 - purificación del ADNm oxidado y/o desmetilado a partir del lisado celular.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el factor de estrés se selecciona de dicromato, peróxido de hidrógeno, permanganato, quinidina, D-pencilamina, hidralazina, procainamida, metabolitos de ARN/ADN, análogos nucleosídicos y nucleotídicos tales como 5-aza-citidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, inhibidores de ADN metilasas, inhibidores de histona desacetilasas tales como butiratos o tricotostatina A, inhibidores de histona acetiltransferasas, inhibidores de histona arginina e histona lisina metiltransferasas, inhibidores de proteína quinasas tales como estaurosporina o calfoestina C o K-252a o H-89, activadores de proteína quinasas tales como ésteres de forbol o briostatina 1, inhibidores de proteína fosfatasa tales como caliculina A o ácido okadaico, inhibidores de la poli(ADP-ribosa)polimerasa tales como 3-aminobenzamida o m-yodobencilguanidina hemisulfato, inhibidores de enzimas conjugadoras de ubiquitinas tales como ubiquitina metilada, inhibidores de la ubiquitina C-terminal hidrolasa tales como ubiquitina aldehído, inhibidores de enzimas involucradas en la corrección de errores de replicación y/o daño espontáneo del ADN tales como iones cadmio, inhibidores de la N-glicosilación tales como tunicamicina, inhibidores de 20S o 26S proteasomas tales como lactacistina, inhibidores de la farnesilación tales como el ácido alfa-hidroxi-farnesilfosfónico, inhibidores de la geranilgeranilación, inhibidores de la metilación de proteínas tales como la ebelactona B, inhibidores de la catalasa, inhibidores de la superóxido dismutasa, inhibidores de la glutatión peroxidasa, inductores de la hipermetilación del ADN, inductores de la metilación de los fosfolípidos, inhibidores de la metilación de los fosfolípidos tales como la 3-deazaadenosina o 3-deaza-(±)-aristeromicina, o combinaciones de los mismos.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ADNm oxidado y/o desmetilado se asocia con proteínas de unión a ácidos nucleicos.
4. ADN de membrana (ADNm) oxidado y/o desmetilado que se puede obtener de acuerdo con el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. ADNm de acuerdo con la reivindicación 4 asociado con proteínas de unión al ADN, en especial histonas.
6. ADNm de acuerdo con la reivindicación 5, en el que las proteínas de unión al ADN son hipo- o hiperacetiladas y/o hipo- o hiperfosforiladas, y/o hipo- o hipermetiladas, y/o hipo- o hiper-ubiquitinadas, y/o hipo- o hiper-(poli-ADP-ribosiladas), y/o hipo- o hiperligosiladas, o sus combinaciones.
7. Un agente diagnóstico que comprende el ADNm de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 o células que se pueden obtener por un procedimiento para preparar células que comprenden ADN de membrana oxidado y/o desmetilado, que comprende la etapa de tratar una célula con un factor de estrés seleccionado del grupo que consiste en irradiación UV, reactivos oxidantes, sales de metales pesados, fármacos, análogos nucleosídicos y nucleotídicos, inhibidores enzimáticos, activadores enzimáticos y cambio de pH, en el que el tratamiento con los factores de estrés aumenta la cantidad de ADN de membrana oxidado y/o aumenta la desmetilación del ADN de membrana en la célula.
8. Un procedimiento para la detección in vitro de lupus eritematoso sistémico (SLE) que comprende las etapas de
 - poner un fluido biológico de un animal que contiene anticuerpos en contacto con el agente diagnóstico de la reivindicación 7
 - medir la unión de dichos anticuerpos con dicho agente diagnóstico, donde la unión indica una enfermedad del animal.
9. Un procedimiento para la detección in vitro del **lupus eritematoso sistémico (SLE)** que comprende las etapas de
 - poner una muestra biológica de un animal que contiene células en contacto con anticuerpos dirigidos contra el ADNm oxidado y/o desmetilado de la reivindicación 4
 - medir la unión de dichos anticuerpos con dichas célulasen el que la unión indica una enfermedad del animal.
10. Uso del agente diagnóstico de la reivindicación 7 para detectar la unión de los anticuerpos al ADNm in vitro.

11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la unión de los anticuerpos de un animal indica una enfermedad autoinmune del animal.
12. Un procedimiento para seleccionar fármacos por medición de la unión de los anticuerpos al ADNm de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 en presencia de un fármaco.
- 5 13. Una formulación farmacéutica que comprende el ADNm de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
14. La formulación farmacéutica de la reivindicación 13 en forma de vacuna.
15. Uso del ADNm de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 para la preparación de un medicamento para tratar enfermedades autoinmunes en un animal.